

Chinonbindestellen in Cytochrom bc Komplexen aus Chloroplasten und Mitochondrien

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Maria Freudenberg
aus Weinheim

Bochum 1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CHINONBINDESTELLEN IN CYTOCHROM bc KOMPLEXEN

AUS CHLOROPLASTEN UND MITOCHONDRIEN

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von
Maria Freudenberg
aus Weinheim

Bochum 1988

Referent : Prof. Dr. A. Trebst

Korreferent : Prof. Dr. E. Weiler

Herrn Prof. A. Trebst danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die großzügige Unterstützung bei der Beschaffung von Arbeitsmaterialien und seinem steten Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. W. Oettmeier und K. Masson danke ich für die zahlreichen, chemischen Synthesen (Salicylamidderivate, Deformamidoazidoantimycin, Ubichinon 2 und Azido-Plastochinon).

Meiner Laborkollegin M. Kipper möchte ich für die zahlreichen Diskussionen und das ausgezeichnete Arbeitsklima danken.

Frau K. Frank, die im Rahmen ihrer Staatsexamensarbeit an dem DCMU Projekt mitgearbeitet hat, möchte ich für die sehr gute Zusammenarbeit danken.

Bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls möchte ich mich für die freundliche Hilfsbereitschaft bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS:

Abkürzungen

1.EINLEITUNG	1
2.MATERIAL UND METHODEN	8
2.1. MITOCHONDRIEN AUS RINDERHERZ	8
2.2. PRÄPARATION VON KOMPLEX III AUS RINDERHERZ-MITOCHONDRIEN	9
2.3. ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN AUS <u>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</u>	11
2.3.1. Enzymatische Methode	11
2.3.2. Dynamill Methode	13
2.4. ISOLIERUNG VON KOMPLEX III AUS HEFEMITOCHONDRIEN	15
2.4.1. Präparation von submitochondrialen Partikeln aus Hefe	15
2.4.2. Isolierung der Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase aus submitochondrialen Partikeln aus Hefe	15
2.5. PRÄPARATION VON PLASTOCHINOL PLASTOCYANIN OXIDOREDUKTASE AUS SPINAT	17
2.6. ISOLIERUNG VON PLASTOCYANIN AUS SPINAT	17
2.7. ISOLIERUNG VON FERREDOXIN AUS SPINAT	18
2.8. HERSTELLUNG VON SPINATTHYLAKOIDEN	19
2.9. PRÄPARATION VON PHOTOSYSTEM II PARTIKELN	19
2.10. ISOLIERUNG VON ANTIMYCIN AUS STREPTOMYCES	20
2.10.1. Anzucht der Streptomyceten	20
2.10.2. Isolierung von Antimycin	20
2.11. QUANTIFIZIERUNG VON ANTIMYCIN	21
2.12. BESTIMMUNG DER CYTOCHROMGEHALTE	23
2.13. FERREDOXIN ABHÄNGIGE ZYKLISCHE PHOTO-PHOSPHORYLIERUNG	23
2.14. PMS ABHÄNGIGE ZYKLISCHE PHOTOPHOSPHORYLIERUNG	23
2.15. MESSUNG DES RESPIRATORISCHEN ELEKTRONENTRANSPORTS	24
2.16. BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON CYTOCHROM bc KOMPLEXEN	24
2.17. STEADY STATE MESSUNGEN AN CYTOCHROM bc KOMPLEXEN AUS RIND UND HEFE	25
2.18. PROTEINBESTIMMUNGEN	26
2.19. CHLOROPHYLLBESTIMMUNG	26

2.20.BINDUNGSEXPERIMENTE	26
2.20.1. Mit Mitochondrien und Thylakoiden	27
2.20.2. Mit Photosystem II Partikeln	27
2.20.3. Mit Photosystem I Vesikeln	27
2.20.4. Mit Cytochrom bc Komplexen	28
2.21.VERDRÄNGUNGEN	28
2.22.PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNGEN	29
2.23.POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE	29
2.24.SEQUENZIERUNG DER 30 KD BANDE DES CYTOCHROM bc ₁ KOMPLEX AUS HEFE	30
2.25.IMMUNOBLOTS	30
2.26.SYNTHESE VON AZIDO-ANTIMYCIN	31
2.27.SYNTHESE VON UBICHINOL 2	31
2.28.SYNTHESE VON SALICYLAMIDDERIVATEN	31
2.29.KULTURMEDIUM UND AGAR	32
2.29.1. Medium zur Anzucht von <u>Saccharomyces</u> <u>cerevisiae</u>	32
2.29.2. Medien zur Anzucht von Streptomyces	32
2.29.3. Festagar zur Stammerhaltung der Hefen und der Streptomyceten	33
2.30.GERÄTE UND CHEMIKALIEN	33
2.30.1. Geräte	33
2.30.2. Chemikalien	34
3. ERGEBNISSE	36
3.1. CHARAKTERISIERUNG DER ORGANELLEN UND PROTEIN- KOMPLEXE	36
3.1.1. Rinderherzmitochondrien	36
3.1.2. Cytochrom bc ₁ Komplex aus Rind	38
3.1.3. Hefemitochondrien	40
3.1.4. Cytochrom bc ₁ Komplex aus Hefe	43
3.1.5. Spinatthylakoide	44
3.1.6. Cytochrom b ₆ f Komplex aus Spinat	44
3.2. HEMMSTOFFEIGENSCHAFTEN DER ANTIMYCINDERIVATE	47
3.3. SYNTHESE VON RADIOAKTIVEM ANTIMYCIN IN VIVO	52
3.3.1. Isolierung von Antimycin aus Streptomyces	53
3.3.2. Quantifizierung und Charakterisierung von Antimycin	53
3.3.2.1. Fluorimetrische Bestimmung von Antimycin	54

3.3.2.2. Spektrophotometrische Bestimmung und Charakterisierung von Antimycin	55
3.3.2.3. Quantifizierung und Charakterisierung von Antimycin mit HPLC	57
3.3.2.4. Quantifizierung und Charakterisierung von Antimycin mit einem Bioassay	60
3.3.3. Verlauf der Antimycinproduktion in den Streptomycetenkulturen	62
3.3.4. Radioaktive Synthese von Antimycin in Streptomycetenkulturen	62
3.3.4.1. Einbau von 2-[^{14}C]- $\text{CH}_2\text{COO}-\text{Na}$ in Antimycin	63
3.3.4.2. Einbauversuch mit radioaktivem Mannit, Glycerin, Leucin und Phenylalanin	65
3.3.4.3. Einbau von [^3H]-Tryptophan und [^3H]-Methionin in Antimycin	68
3.3.4.4. Präparative Isolierung von radioaktivem Antimycin aus Streptomyces	71
3.4. BINDUNGSEXPERIMENTE MIT RADIOAKTIVEM ANTIMYCIN	74
3.4.1. Bindung von Antimycin an Rindermitochondrien	75
3.4.2. Bindung von Antimycin an Hefemitochondrien	81
3.4.3. Bindung von Antimycin an Spinatthylakoide und an Photosystem II Partikel	84
3.4.4. Bindung von Antimycin an Photosystem I Vesikel	90
3.4.5. Bindung von Antimycin an isolierte Cytochrom bc Komplexe	91
3.4.5.1. Abtrennung der Cytochrom bc Komplexe vom Reaktionsmedium	91
3.4.5.2. Bindung von Antimycin an Cytochrom bc Komplexe	92
3.5. SYNTHESE VON RADIOAKTIVEM DEFORMAMIDOAZIDO-ANTIMYCIN	95
3.6. VERDRÄNGUNG VON [^3H]-ANTIMYCIN DURCH ANDERE HEMMSTOFFE	96
3.6.1. Verdrängung mit THBP	96
3.6.2. Verdrängung von [^3H]-Antimycin durch DCMU	99
3.7. CHARAKTERSIERUNG DER DCMU BINDESTELLE IN HEFEMITOCCHONDRIEN	101

3.7.1. Iso Bestimmungen an Hefemitochondrien aus dem Wildtyp und aus dem DCMU resistenten Stamm	102
3.7.2. DCMU Bindung an Hefemitochondrien	103
3.7.3. Umgehung der DCMU Hemmung in Hefemitochondrien durch DCPIPH ₂	104
3.7.4. Steady state Messungen am Cytochrom bc ₁ Komplex aus Hefe	105
3.7.5. Photoaffinitätsmarkierungen mit [¹⁴ C]-Azido-Monuron und mit [¹⁴ C]-Azido-Plastochinon an Mitochondrien und Komplex III aus Hefe und Rind	109
3.7.5.1. Photoaffinitätsmarkierungen mit Azido-Monuron	109
3.7.5.2. Photoaffinitätsmarkierungen mit Azido-Plastochinon	114
3.7.6. Identifizierung des 30 kD Proteins durch Sequenzanalyse	117
3.7.7. Identifizierung des markierten 30 kD Peptids mit Western Blots	117
3.8. HEMMUNG DER OXIDOREDUKTASE AKTIVITÄTEN DURCH AURACHINE	119
3.9. STEADY STATE MESSUNGEN AM CYTOCHROM bc ₁ KOMPLEX AUS RIND	121
4. DISKUSSION	127
5. ZUSAMMENFASSUNG	152
LITERATURVERZEICHNIS	155

ABKÜRZUNGEN:

BAL	British Anti-Lewisite (2,3-Dimercaptopropanol)
Cyt	Cytochrom
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-1,4-benzochinon
DCMU	3-(3',4'-Dichlorphenyl)-1,1-dimethyl-harnstoff = Diuron
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-indophenol
DH	Dehydrogenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP-INT	2-Jod-4-nitro-6-isopropyl-3-methyl-2,4-dinitro- diphenylether
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Titriplex III)
Fd	Ferredoxin
FeS	Eisen-Schwefel-Protein
Ferricyanid	Kaliumhexacyanoferrat (III)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfon- säure
HPFMC	4-Hydroxy-3-brom-2,6 difluoromethylchinolin
HQNO	2-N-Heptyl-4-hydroxychinolin-n-oxid
kB	Bindungskonstante
kD	Kilodalton
MES	2-Morpholino-ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
Pcy	Plastocyanin
pkB	negativ dekadischer Logarithmus der Bindungs- konstante
PMS	N-Methyl-phenoazonium-methsulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PQ	Plastoquinon
PS	Photosystem
Q	Chinon
Q ⁻	Semichinon
QH ₂	Hydrochinon
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethyl-ethylendiamin
THBP	Tetrabrom-4-hydroxypyridin
TRICIN	N-(Tris(hydroxymethyl)-methyl)-glycin

TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UHDBT	5-N-undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol
UQ	Ubichinon

1.EINLEITUNG:

In der vorliegenden Arbeit soll ein Proteinkomplex, der an der Energiekonservierung bei der Photosynthese und der Respiration maßgeblich beteiligt ist, mit Hilfe von Hemmstoffen untersucht werden.

An der inneren mitochondrialen Membran werden NADH und Succinat über vier Multienzymkomplexe oxidiert. Komplex I, die NADH-Ubichinonreduktase, und Komplex II, die Succinat-Ubichinonreduktase, übertragen Elektronen auf den mobilen Elektronencarrier Ubichinon. Komplex III, die Ubichinon-Cytochrom-c-Reduktase oxidiert den reduzierten Ubichinonpool und überträgt die Elektronen auf den zweiten mobilen Elektronenüberträger, Cytochrom c. Cytochrom c wird durch die Cytochrom-c-Oxidase, Komplex IV, oxidiert (Übersichtsartikel: Wikström & Sarate 1984, Tzagaloff 1982, Hatefi 1985). Die bei der Oxidation freiwerdende Redoxenergie wird durch einen an die Elektronenübertragung gekoppelten Protonentransport zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten genutzt. Dieses Membranpotential, zu dessen Aufbau die Komplexe I, III und IV beitragen, stellt die treibende Kraft für die ATP Synthese dar (Mitchell 1979).

In Pflanzenzellen existiert zusätzlich der photosynthetische Elektronentransport, bei dem in der Thylakoidmembran der Chloroplasten Elektronen von H_2O auf NADP übertragen werden. In deren Lichtreaktionen wird ein Redoxsystem mit stark negativem Redoxpotential ($NADPH_2/NADP$) von einem Redoxsystem mit elektropositivem Redoxpotential ($H_2O/1/2 O_2$) reduziert, d.h. der Prozeß ist endergonisch. Er wird durch Lichtenergie möglich, durch die im Photosystem I und II Elektronen auf ein energiereiches Niveau angehoben und auf Akzeptoren übertragen werden, die ein sehr viel elektronegativeres Redoxpotential haben. So stellt Photosystem I im angeregten Zustand das bisher stärkste, in der lebenden Zelle bekannte, Reduktionsmittel dar. Die beiden Photosysteme sind funktionell über einen dritten integralen Proteinkomplex, den Cytochrom b_6f Komplex, verbunden. Der Cytochrom b_6f Komplex ist im photosynthetischen Elektronentransport ebenso wie der Komplex III im respiratorischen

Elektronentransport an dem Aufbau eines Membranpotentials beteiligt.

Cytochrom bc_1 Komplexe (Komplex III) und der Cytochrom b_6f Komplex aus Spinat können als aktive Proteinkomplexe isoliert werden. Sie enthalten als Redoxkomponenten ein Cytochrom c-Häm, zwei Cytochrom b-Häme und ein Eisen-Schwefel-Protein, auch Rieske Protein genannt (Rieske 1976, Hurt & Hauska 1981, Engel et al 1980). Die Aminosäuresequenzen dieser Proteine, die die Redoxkomponenten tragen, sind von vielen Organismen (Cyano-bakterien, Purpurbakterien, Hefe, Rind, Spinat u.a.) bekannt. Ein Vergleich der Sequenzen zeigt, daß diese Proteine konservierte Sequenzen enthalten, die auf funktionell essentielle Bereiche hinweisen. Alle Cytochrome b aus dem respiratorischen Elektronentransport zeigen eine hohe Aminosäurehomologie und eine noch höhere Hydropathie-Index-Homologie. Darüberhinaus ist das mitochondriale Cytochrom b mit einem Molekulargewicht von 43 kD homolog mit dem plastidären Cytochrom b mit 23 kD und der 17 kD Untereinheit des Cytochrom b_6f Komplexes (Gabellini 1988, Widger et al 1984). Alle bisher bekannten Cytochrome b aus bakteriellen, mitochondrialen und photosynthetischen Cytochrom bc Komplexen weisen vier konservierte Histidine an äquivalenten Positionen auf. Nach dem Modell von Widger et al, binden diese Histidine die zwei Hämgruppen im Cytochrom b so, daß die Hämgruppen senkrecht zur Membranoberfläche auf beiden Seiten der Membran liegen. Die 17 kD Untereinheit des Cytochrom b_6f Komplexes, die homolog mit dem C-terminalen Ende des mitochondrialen Cytochrom b ist, könnte an der Bindung von Plastochinon beteiligt sein (Widger et al 1984).

Der Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind und Hefe enthält neben den drei Proteinen, die Redoxkomponenten tragen, zwei sogenannte Core Proteine mit Molekulargewichten zwischen 40 und 50 kD und 4-6 kleinere Untereinheiten; es bestehen für manche dieser Untereinheiten Hypothesen über ihre Funktionen, jedoch sind viele Fragen offen geblieben (Schägger et al 1985, Ljungdahl et al 1987). Diese Untereinheiten sind nicht in allen bakteriellen Cytochrom bc_1 Komplexen nachweisbar (Gabellini 1988, Yang et al 1987). Im Cytochrom b_6f Komplex findet man neben Cytochrom b und f, dem Rieske Protein und der 17 kD Untereinheit nur ein 5

kD Peptid (Bogorad, 1988).

Cytochrom bc_1 und Cytochrom b_6f Komplexe übertragen Elektronen von einem Zwei-Elektronenüberträger, Ubichinol in Mitochondrien bzw. Plastochinol in Chloroplasten, auf einen Ein-Elektronenüberträger, Cytochrom c bzw. Plastocyanin. Die Enzymaktivitäten von isolierten Cytochrom bc Komplexen (Überbegriff für Cytochrom bc_1 und Cytochrom b_6f Komplexe) können mit Hilfe von reduzierten Chinonen als Elektronendonatoren und mit Cytochrom c oder Plastocyanin als Akzeptoren gemessen werden. Obwohl die Cytochrom bc Komplexe große Homologien aufweisen, sind nicht alle Verbindungen, die die Reduktion von Cytochrom c im Cytochrom bc_1 Komplex hemmen, auch Hemmstoffe des Cytochrom b_6f Komplexes. So hemmen Antimycin und Myxothiazol nur den Elektronentransport im Cytochrom bc_1 Komplex, DBMIB und DNP-INT dagegen nur den im Cytochrom b_6f Komplex. Andere Hemmstoffe, wie Stigmatellin und UHDBT dagegen wirken in beiden Komplexen gleichermaßen (Rich 1984).

Die Wirkung von Hemmstoffen auf den Elektronentransport kann in Cytochrom bc Komplexen genauer untersucht werden, indem die Reduktion der Redoxkomponenten verfolgt wird. So kann die Reduktion der Cytochrom b -Häme und des Cytochrom c -Häms spektrophotometrisch gemessen werden. Deul & Thorn fanden bereits 1962, daß die Reduktion von Cytochrom b nur vollständig blockiert wird, wenn zwei Hemmstoffe, Antimycin und BAL, gleichzeitig anwesend sind. Aus diesem Ergebnis und vielen neueren Untersuchungen am isolierten Cytochrom bc_1 Komplex entwickelten sich unterschiedliche Hypothesen über die zwei Wege, auf denen Cytochrom b reduziert werden kann: ein Weg wird durch einen Hemmstoff vom Antimycin-Typ, der andere Weg durch einen Hemmstoff wie Myxothiazol, UHDBT oder BAL blockiert (von Jagow & Link 1986).

Modelle, die den Elektronen- und den damit verbundenen Protonentransport in Cytochrom bc Komplexen beschreiben wollen, müssen außerdem erklären, warum mit einem Elektron, das von einem Chinol auf Cytochrom c bzw. Plastocyanin übertragen wird, nicht nur ein Proton, sondern zwei Protonen über die Membran transportiert werden (Beattie & Villalobo 1982, Willms et al 1987). Aus der Beobachtung, daß Ubichinol in zwei Schritten mit

unterschiedlichen Redoxpotentialdifferenzen und mit Semichinon als Intermediat oxidiert wird, postulierten Wikström & Berden einen verzweigten Elektronentransportweg im Cytochrom bc_1 Komplex (1972). Die Beobachtungen von Wikström & Berden und Deul & Thorn führten 1975 zur Formulierung des Q-Zyklus durch Mitchell. Neben dem Q-Zyklus, der inzwischen von mehreren Autoren modifiziert wurde (von Jagow et al 1986, de Vries et al 1982), bestehen andere Modelle wie z. B. der b-Zyklus (Wikström et al 1981), und der Semichinon-Zyklus (Wikström & Krab 1986). Bei allen Modellen nimmt Cytochrom b eine Sonderstellung ein. Die zwei Hämgruppen des Cytochrom b sind nicht gleichartig: das Redoxpotential der einen Hämgruppe b_L beträgt in Mitochondrien -50mV, das der anderen Hämgruppe b_H +50mV (von Jagow et al 1986). Die Anordnung der Hämgruppe mit dem elektronegativen Redoxpotential Cytochrom b_L auf der einen und der elektropositiven Hämgruppe b_H auf der anderen Seite der Membran ermöglicht eine Übertragung des Elektrons über die Membran. Zu Beginn eines Zyklus wird von einem Chinol ein Elektron auf das Rieske Protein übertragen, das dann entstandene Semichinon reduziert die Cytochrom b_L Hämgruppe. Diese gibt das Elektron auf die Cytochrom b_H Hämgruppe, die sich auf der anderen Seite der Membran befindet, weiter. Die Cytochrom b_H Hämgruppe reduziert ein Chinon. Dabei werden Protonen aufgenommen und mit dem Chinol über die Membran transportiert. Es wird also eines der beiden Elektronen des Chinols über Cytochrom b auf ein Chinon zurückgeführt. Dadurch entsteht ein Zyklus, der den zusätzlichen Transport eines Proton über die Membran bedingt. Der hauptsächliche Unterschied zwischen den verschiedenen Modellen liegt bei der Vorstellung wie das Chinon reduziert wird (Abb. 1). Beim 'klassischen' Q-Zyklus nach Mitchell wird das eine Elektron von der Cytochrom b_H Gruppe auf das Chinon übertragen, das andere, für die Reduktion von Chinon zum Chinol notwendige Elektron, stammt von der Succinat- oder NADH-Dehydrogenase. Im isolierten Cytochrom bc_1 Komplex ist jedoch keine Dehydrogenase vorhanden, die das zweite Elektron stellen kann. Trotzdem findet man auch dort eine Stöchiometrie von 2 Protonen zu einem Elektron. Der 'klassische' Q-Zyklus liefert demnach keine Erklärung, woher das zweite Elektron zur Chinon-

reduktion im isolierten Cytochrom bc_1 Komplex kommt. Bei dem 'modifizierten' Q-Zyklus nach von Jagow (1986) reduziert die Hämgruppe b_h des Cytochrom b in zwei aufeinanderfolgenden Schritten das Chinon. Dagegen stammt bei dem Semichinon-Zyklus nur ein Elektron von der Cytochrom b_h Gruppe. Dieses Elektron wird aber auf ein Semichinon übertragen, das an der chinol-oxidierenden Seite entstanden ist und als Anion durch die Membran zu der chinonreduzierenden Seite wandert. Ein weiteres Modell sieht einen funktionell dimeren Komplex vor, in dem die beiden Monomere an der chinonreduzierenden Seite kooperieren und jedes Monomer ein Elektron zur Reduktion von Chinon beiträgt (de Vries et al 1982, de Vries 1986).

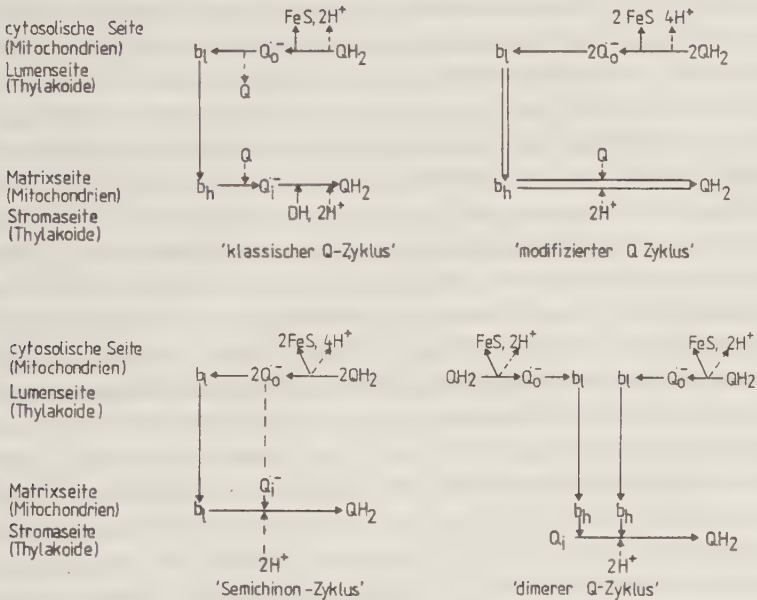


Abb. 1: Vereinfachte Modelle zum Mechanismus des Elektronentransfers in Cytochrom bc Komplexen. 'klassischer' Q-Zyklus nach Mitchell (1975), 'modifizierter' Q-Zyklus nach von Jagow et al (1986), 'Semichinon Zyklus' nach Wikström & Krab (1986), 'dimerer Q-Zyklus' nach de Vries et al (1982).

Um die chinonreduzierende Seite im photosynthetischen und mitochondrialen Cytochrom bc Komplex zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit Hemmwirkung und Bindungskinetik von Antimycin untersucht. Antimycin hemmt die Reoxidation von Cytochrom b im mitochondrialen Cytochrom bc_1 Komplex und verschiebt das Absorptionsmaximum der Cytochrom b_h Hämgruppe, die an der Bildung der chinonreduzierenden Seite beteiligt ist. (von Jagow et al 1986, Slater 1973). Eine Kooperation der beiden Monomere in einem dimeren Cytochrom bc Komplex an der chinonreduzierenden Seite, wie sie in dem 'doppelten' Q-Zyklus nach de Vries (1986) gefordert wird, müßte einen Einfluß auf die Bindungskinetik von Antimycin haben. Die Bindung von Antimycin an Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplexen soll in dieser Arbeit im Hinblick auf die verschiedenen Zyklusmodelle untersucht werden. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welches Protein in Spinatthylakoiden Antimycin bindet. Trotz der großen Homologie zwischen den Cytochrom bc_1 Komplexen und dem Cytochrom b_6f Komplex, kann kein Einfluß von Antimycin auf den isolierten Cytochrom b_6f Komplex beobachtet werden (Hauska et al 1983). Es ist schon seit langem bekannt, daß der lineare photosynthetische Elektronentransport nicht durch Antimycin gehemmt wird (Arnon et al 1967). Mithin stellt sich sogar die Frage, ob Cytochrom b überhaupt am linearen Elektronentransport beteiligt ist (Cramer et al 1987). Jedoch wird der Ferredoxin abhängige, zyklische Elektronentransport, der in vivo zur Synthese von ATP betrieben wird, von Antimycin gehemmt. (Arnon et al 1967).

In Chloroplasten kann neben dem schnellen Anstieg des elektrischen Feldes, der durch die Ladungstrennungen in den beiden Photosystemen erfolgt, ein langsamer Anstieg des elektrischen Feldes beobachtet werden (Slovacek & Hind 1978, Velthuys 1978), der auf einen zusätzlichen Transport von Ladungen über die Membran deutet. Dieser langsame Anstieg des elektrischen Feldes wird einer Reaktion im Cytochrom b_6f Komplex zugeordnet, bei dem ein elektrogener Schritt über die Membran erfolgt (Crowther & Hind 1982). Neben der Stöchiometrie von zwei Protonen pro Elektron, die sowohl für Cytochrom bc_1 Komplexe als auch für den Cytochrom b_6f Komplex nachgewiesen wurden, spricht auch der

langsame Anstieg des elektrischen Feldes für einen der vorgestellten Zyklen im Cytochrom b_6f Komplex (Selak & Whitmarsh 1982).

Auch die mitochondrialen Cytochrom bc_1 Komplexe sind gegenüber Hemmstoffen unterschiedlich empfindlich. So hemmt DCMU den mitochondrialen Elektronentransport in Hefe, nicht aber den in Rind. Man vermutet, daß DCMU ebenfalls an der chinonreduzierenden Seite wirkt (Convent & Briquet 1978). Diese Arbeit soll als weiteren Zugang zur chinonreduzierenden Seite die Wirkung und Bindestelle von DCMU in Hefe- und Rindmitochondrien bzw. in den daraus isolierten Cytochrom bc_1 Komplexen vergleichend untersuchen. Hefe ist als Untersuchungsobjekt von besonderer Bedeutung, da hemmstoffresistente Mutanten erzeugt und deren Mutationen genau charakterisiert werden konnten (Colson & Slonimski 1979). Für die vorliegende Arbeit stellte Dr. A. Colson, Louvain-La-Neuve freundlicherweise eine DCMU resistente Mutante zur Verfügung.

Um die Bindungskinetiken von Hemmstoffen zu untersuchen, ist es notwendig, einige, wenige Hemmstoffmoleküle exakt zu bestimmen. Das geschieht in der Regel durch radioaktive Markierung des Hemmstoffs. Im Gegensatz zu Antimycin ist DCMU als radioaktive Substanz käuflich zu erwerben. Antimycin kann aufgrund seiner komplizierten Struktur chemisch nur sehr schwer synthetisiert werden. In der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, ein Analogon mit den gleichen Hemmeigenschaften wie Antimycin zu finden, das aber aufgrund seiner einfacheren Struktur chemisch radioaktiv synthetisierbar ist. Weiterhin soll Antimycin aus Streptomycetenkulturen isoliert und in vivo radioaktiv markiert werden.

2.MATERIAL UND METHODEN:

2.1.MITOCHONDRIEN AUS RINDERHERZ (nach Smith 1967, modifiziert):

Die Präparation wurde im Kühlraum durchgeführt.

- 1) Vom Schlachthof geholtes Rinderherz von Fett und Sehnen befreien, in gulaschgroße Stücke schneiden und zweimal in Medium I (250 mM Saccharose, 10 mM TRIS ph 7,4, 2 mM EDTA) waschen.
- 2) Die gewaschenen Fleischstücke durch einen elektrischen Fleischwolf mit einem Sieb, dessen Löcher 2 mm Durchmesser haben, drehen.
- 3) Je 250 g Fleisch mit 1250 ml Medium II (250 mM Saccharose, 10 mM TRIS pH 7,4, 0,5 mM EDTA) und 10 ml uneingestellter 1 M TRIS in einem Waring Blendor CB 5 5s auf niedriger und 30s auf höchster Stufe homogenisieren. Die Suspension so mit Medium II verdünnen, daß sich 500 g Fleisch in 3750 ml befinden. Den pH Wert mit 1 M TRIS auf 7,4 einstellen.
- 4) 15 Minuten bei 1 800 rpm (500 g) im GS3 Rotor zentrifugieren.
- 5) Den Überstand über dreilagige Gaze filtrieren.
- 6) 30 Min bei 7 000 rpm (8 300 g) im GS 3 zentrifugieren.
- 7) Den Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe absaugen, um aufliegende Lipide zu entfernen.
- 8) Pellet mit ungefähr 700 ml Medium II/pro Herz aufnehmen und mit einem Potter homogenisieren.
- 9) Suspension 10 Min bei 1 500 rpm im GS 3 (300 g) zentrifugieren.
- 10) Überstand 30 Minuten bei 7 000 rpm (8 300 g) zentrifugieren.
- 11) Sediment mit möglichst wenig Medium II aufnehmen und homogenisieren.

Die Mitochondrien wurden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Ausbeute lag bei ungefähr 4,5 g mitochondrialem Protein pro Herz.

Die Mitochondrien enthielten pro mg Protein mindestens 0.5

nMole Cytochrom b-Häm (nMol Cytochrom b-Häm zu mg Protein Verhältnis 0.5).

2.2. PRÄPARATION VON KOMPLEX III AUS RINDERHERZMITOCHONDRIEN:

Ubichinol Cytochrom c Oxidoreduktase wurde nach der Methode von Engel et al (1980) präpariert.

Die Proteinbestimmungen während der Präparation wurden mit dem Pierce BCA Protein Assay durchgeführt; die Proben wurden dabei mit 1% Triton X100 verdünnt, um eine gute Solubilisierung zu gewährleisten. Der Blindwert wurde entsprechend mit 1 % Triton x100 angesetzt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die bei der Komplex III Präparation verwendeten Puffer den Pierce Proteinassay nicht stören.

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

- 1) Die in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Rinderherzmitochondrien auftauen.
- 2) 15 Minuten bei 15 000 rpm (27 000 g) im SS 34 Rotor abzentrifugieren.
- 3) Mit 20 mM MOPS pH 7.2 auf 35 mg Protein/ml einstellen und mit einem Potter homogenisieren.
- 4) Pro 100 ml Mitochondriensuspension werden unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer 11.6 ml 20 % Triton X100 (Serva für Scintillationstechnik!) und nach zweiminütigem Rühren 20 ml 4 M NaCl zugegeben.
- 5) Nach weiteren 3 Minuten Rühren 45 Minuten bei 31 500 rpm (100 000g) in einem 60 Ti Beckman Rotor zentrifugieren.
- 6) Den Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe absaugen.
- 7) Pellet mit etwas 300 mM Saccharose, 20 mM MOPS pH 7.2 aufnehmen und nach einer Proteinbestimmung auf 35 mg Protein/ml einstellen.

Mit Hilfe eines Redoxdifferenzspektrums konnten 80% der in den Mitochondrien enthaltenen Cytochrome b im Pellet wiedergefunden werden; das nMol Cytochrom b-Häm zu mg Protein Verhältnis betrug 0.62.

- 8) Suspension unter ständigem Rühren mit einem gleich großen Volumen 4% Triton X100, 1.2 M NaCl, 300 mM Saccharose,

20 mM MOPS versetzen, 5 Minuten rühren und nach 15 Minuten die Ultrazentrifuge starten.

- 9) 35 Minuten bei 31 500 rpm im 60 Ti (100 000 g) zentrifugieren.

Der Überstand enthielt noch 67 % der Cytochrome b des Ausgangsmaterials und pro mg Protein 0.78 nMole Cytochrom b-Häm.

- 10) Den Überstand zu einer volumenmäßig gleichen Menge abgesetztem Hydroxyapatit geben. Das Hydroxyapatit in 0.5% Triton X100, 0.25 M NaCl, 0.08 M Phosphat pH 7.2, 2 mM NaN_3 vorequilibrieren und von dem überstehendem Puffer trennen.

- 11) Das Hydroxyapatit 2 Minuten mit einem Glasstab vorsichtig rühren und anschließend stehen lassen, bis es sich vollständig abgesetzt hat. Falls sich das Hydroxyapatit nach 25 Minuten noch nicht abgesetzt hat, kann es bei 700 rpm innerhalb von 2 Minuten im GSA (100 g) sedimentiert werden.

- 12) Den Überstand mit Hilfe eines Redoxdifferenzspektrums auf Komplex III untersuchen und falls nötig bis zur vollständigen Bindung der Cytochrome weiteres Hydroxyapatit zufügen.

- 13) Den Überstand dann absaugen und das Sediment mit 2 fachem Volumen 0.04% Triton x100, 0.25 M NaCl, 0.09 M Phosphat pH 7.2, 2 mM NaN_3 versetzen, 3 Minuten vorsichtig rühren, absitzen lassen und den Überstand absaugen.

- 14) Das Sediment mit gleichem Volumen 0.04% Triton X100, 0.25 M NaCl, 0.09 M Phosphat pH 7.2, 2 mM NaN_3 aufrühren und in eine Säule gießen.

- 15) Die Säule mit einem halben Säulenvolumen desselben Puffers waschen und dann mit 200 mM Phosphat pH 7.2, 0.25 % Triton X100 fraktioniert eluieren.

- 16) Den Cytochromgehalt der Fraktionen bestimmen und die Fraktionen entsprechend vereinigen.

- 17) In einer Amicon Zelle mit einer Amicon YM 100 Membran auf ungefähr 20 mg Protein/ml einengen.

Das eingeeengte Eluat enthielt 33 % der im Ausgangsmaterial enthaltenen Cytochrome und pro mg Protein 3 nMole Cytochrom b-Häm.

- 18) Das eingeeengte Eluat auf eine Sepharose CL 6 B Gelfiltrationssäule auftragen, die mit 0.05 % Triton X100, 100 mM

NaCl, 2 mM NaN_3 , 20 mM MOPS pH 7.2 vorequibriert ist und mit demselben Puffer fraktioniert eluieren.

Die gepoolten Fraktionen enthielten noch 13 % der Cytochrome b des Ausgangsmaterials und pro mg Protein 4.6 nMole Cytochrom b-Häm..

19) Den isolierten Complex III mit 50 Gew.% Glycerin versetzen und in flüssigem Stickstoff aufbewahren.

2.3. ISOLIERUNG VON MITOCHONDRIEN AUS SACCHAROMYCES CEREVISIAE:

Für die Isolierung der Mitochondrien wurden die Zellen entweder enzymatisch oder in einer Zelmühle mit Hilfe von Glasperlen (Dynomill) mechnisch aufgebrochen.

2.3.1. Enzymatische Methode

Für einige Hemmstoffversuche wurden aus Saccharomyces cerevisiae Kl14-4A W⁺ und der DCMU resistenten Mutante KL 14-4A Diu 2-766 Mitochondrien nach einer Labormethode von A.Colson, Louain-La-Neuve isoliert. Die Hefen wurden dafür von der Agarplatte ausgehend in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml Kulturmedium (siehe Kapitel Medien) in einem Rundschüttler bei 29°C bei 250 rpm angezogen. Die Hauptkulturen wurden in 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 400 ml Kulturmedium unter denselben Bedingungen angezogen und mit der Vorkultur auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml, was einer oD bei 650 nm von 0.5 entspricht, angeimpft.

Alle Schritte im Kühlraum durchführen.

- 1) Hefezellen bei einer oD_{650nm} von 10 durch 10 minütige Zentrifugation bei 1 000 rpm (170 g) im GS 3 Rotor ernten.
- 2) 2 x mit H_2O waschen und mit 20 ml THE Puffer (0.1 M TRIS pH 8.5, 1.56 ml Mercaptoethanol auf 200 ml) aufnehmen.
- 3) Das Gewicht der Hefezellen bestimmen, die Suspension auf 180 ml THE Puffer/pro 30 g Zellen einstellen.
- 4) 1 Stunde bei 33°C im Rundschüttler bei 100 rpm inkubieren.
- 5) Hefezellen bei 5 000 rpm (4 000 g) 15 Minuten im GSA Rotor zentrifugieren.

Als Pellet können die Hefezellen auf dieser Stufe bis zu zwei Tagen im Kühlschrank aufbewahrt werden.

- 6) Pellet 2 x mit H_2O waschen.
 - 7) Suspension bei 1 000 rpm 15 Minuten (160 g) im GSA Rotor zentrifugieren.
 - 8) Pellet mit Medium A (1 M Sorbitol, 10 mM Imidazol, 0.5 mM EDTA pH 6.4) resuspendieren und auf 30 oD bei 650 nm einstellen.
 - 9) Auf 500 ml Hefesuspension 9.2 mg Zymolase (in 125 ml Lösung A gelöst) und 2.83 ml Glusulase geben.
 - 10) Hefesuspension bei 33°C im Rundschtüttler inkubieren und die Bildung der Protoplasten, die durch das Andauen der Zellwände durch Zymolase und Glusulase entstehen, überprüfen.
 - 11) Hierfür 1 ml H_2O + 100µl Hefesuspension in Reagenzglas 1, 1 ml Puffer A + 100µl Hefesuspension in Reagenzglas 2 geben. In Reagenzglas 1 muß innerhalb von 15 Sekunden eine Klärung erfolgen, die auf das Platzen der gebildeten Protoplasten zurückzuführen ist, während Reagenzglas 2 trübe bleibt. Die Protoplastenbildung erfolgt nach etwa 45 Minuten.
 - 12) Protoplasten sofort bei 5 000 rpm (4 000 g) im GSA 10 Minuten zentrifugieren.
 - 13) 3 x mit Lösung B (0.2 % Rinderserumalbumin, 1.3 M Sorbitol, 10 mM Imidazol, 0.5 mM EDTA pH 6.4) waschen, dabei bei 4 000 rpm (2 600 g) im GSA 10 Minuten zentrifugieren.
- Die folgenden Mengenangaben gelten für eine Protoplastenpräparation aus 500 ml Hefesuspension mit 30 oD.
- 14) Protoplasten in 15 ml Lösung C (0.2 % Rinderserumalbumin, 0.3 M Sorbitol, 10 mM Imidazol, pH 6.4) wieder aufnehmen und zu 80 ml stark rührender Lösung C geben.
 - 15) 2 Minuten rühren, 5x am Potter mit hoher Geschwindigkeit homogenisieren.
 - 16) Suspension mit gleichem Volumen Lösung D (0.2 % Rinderserumalbumin, 1 M Sorbitol, 10 mM Imidazol, pH 6.4) versetzen.
 - 17) 5 Minuten bei 4 000 rpm (1 900 g) im SS 34 Rotor zentrifugieren.
 - 18) Überstand 15 Minuten bei 10 000 rpm (12 000 g) im SS 34 zentrifugieren.

- 19) Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe absaugen.
 - 20) Pellet mit 20 ml Lösung E (0.2 % Rinderserumalbumin, 0.6 M Mannitol, 10mM Imidazol) resuspendieren.
 - 21) 10 Minuten bei 3 000 rpm (1 075 g) im SS 34 Rotor zentrifugieren.
 - 22) Überstand bei 10 000 rpm (12 000 g) im SS 34 Rotor zentrifugieren.
 - 23) Pellet in wenig Lösung E aufnehmen.
- Die gewonnen Hefemitochondrien bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff aufbewahren.

2.3.2. Dynamill Methode:

Wo nicht ausdrücklich erwähnt, wurden die Mitochondrien sowohl aus den selbstgezogenen Hefen KL 14 4A W* und KL 14-4a Diu 2-766 als auch aus den bei Uniform gekauften Hefen nach der Methode von Clejan & Beattie (1986) mit Hilfe einer Dynamill isoliert.

I) Dynamill Methode bei selbstgezogenen Hefen:

Die Anzucht von Saccharomyces cerevisiae erfolgte hierfür in einem 30°C Brutschrank mit Druckluft, die in einer Vorflasche angewärmt wurde. Die Hauptkulturen wurden in 15 l Flaschen gezogen und mit einer Vorkultur auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen (das entspricht einer oD von 0.5 bei 650 nm) angeimpft.

Alle Schritte im Kühlraum durchführen.

- 1) Hefezellen bei einer oD_{650nm} von 8 bei 1 000 rpm (170 g) im GS 3 Rotor abzentrifugieren
- 2) 2 x mit KPE Puffer (0.9 %KCl, 50 mM K₂HPO₄, 1 mM EDTA) waschen.
- 3) Hefezellen in 200 ml KPEP Puffer (KPE + 0.5 mM PMSF, PMSF wurde als 100 mM Stammlösung in DMSO frisch angesetzt und unmittelbar vor dem Gebrauch hinzugefügt) aufnehmen.
- 4) Mit 220 ml Glasperlen (0.45 - 0.5 mm) die Hefesuspension in eine auf - 20°C vorgekühlte Dynamillkammer geben und im diskontinuierlichen Verfahren während 10 Minuten aufbrechen.

- 5) Glasperlen abfiltrieren und die Suspension 1:2 mit KPEP Puffer verdünnen.
- 6) 10 Minuten im GS 3 Rotor bei 4 000 rpm (2 600 g) zentrifugieren.
- 7) Überstand auf ursprüngliches Volumen mit KPEP Puffer bringen.
- 8) 10 Minuten bei 4 000 rpm im GS 3 Rotor zentrifugieren.
- 9) Überstand bei 4 000 rpm 10 Minuten im GS 3 Rotor zentrifugieren.
- 10) Überstand bei 10 000 rpm (16 000 g) im GSA Rotor 25 Minuten zentrifugieren.
- 11) Pellet mit KPEP aufnehmen und mit einem Potter homogenisieren.
- 12) 25 Minuten bei 10 000 rpm im GSA Rotor zentrifugieren.
- 13) Pellet mit KPEP aufnehmen, pottern und abzentrifugieren.
- 14) Mitochondrien in möglichst wenig KPEP Puffer aufnehmen.

II) Dynamill Methode mit gekaufter Hefe:

- 1) 1 kg bei Uniferm, Werne gekaufte Hefe zerbröseln.
- 2) In 900 ml KPE (0.9 % KCl, 50 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA) suspendieren und über Nacht bei 20°C auf einem Rundschüttler bei 150 rpm schütteln.
- 3) Zellsuspension auf 4°C kühlen, mit einer frisch angesetzten 100 mM PMSF Lösung (DMSO) auf 0.5 mM PMSF bringen.
- 4) In eine auf -20°C gekühlte DynamillKammer 500 ml Glasperlen (0.45 - 0.5mm) geben und soviel Hefesuspension in die Kammer pumpen, daß die Mahlräder oben 1 cm unbedeckt herausragen.
- 5) Die Dynamill 10 Minuten laufen lassen und dann den Rest der Hefesuspension im kontinuierlichen Verfahren langsam durchpumpen.

Die weitere Präparation erfolgte wie bei der Mitochondrienpräparation aus selbstgezogenen Hefen.

Aus 1 kg Hefe konnten mit dieser Methode an einem Tag 3 g mitochondriales Protein isoliert werden.

2.4. ISOLIERUNG VON COMPLEX III AUS HEFEMITOCHONDRIEN:

2.4.1. Präparation von submitochondrialen Partikeln aus Hefe:

Hefemitochondrien wurden aus gekauften Hefezellen mit der Dynamill Methode isoliert. 6 g mitochondriales Hefeprotein wurde nach der Methode von Clejan & Beattie (1986) zu submitochondrialen Partikeln verarbeitet. Die Proteinbestimmung erfolgte mit Pierce BCA Protein Assay.

Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt.

- 1) Aufgetaute Mitochondrien auf 15 mg/ml Protein einstellen.
- 2) In 40 ml Batches werden die Hefemitochondrien mit einem Branson Sonifier im Salzeisbad drei mal 45 s lang mit jeweils 45 s Pause dazwischen bei 100 Watt mit Ultraschall beschallt.
- 3) 10 Minuten bei 4 250 rpm (2 900 g) im GSA Rotor zentrifugieren.
- 4) Überstand bei 4 250 rpm (2 900 g) im GSA Rotor zentrifugieren.
- 5) Überstand 30 Minuten bei 20 000 rpm (47 800 g) im SS 34 Rotor zentrifugieren.
- 6) Die submitochondrialen Partikel befinden sich im Pellet und werden in Puffer A (50 mM TRIS pH 8.0, 1 mM MgSO_4 , 1 mM PMSF) aufgenommen und mit dem Potter homogenisiert.

2.4.2. Isolierung der Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase aus submitochondrialen Partikeln aus Hefe:

Aus den submitochondrialen Partikeln wurde die Ubiquinol Cytochrom c Oxidoreduktase nach der Methode von Ljungdahl et al (1986) isoliert. Die dort beschriebene KCL Waschung nach Jakobs & Sanadi (1960) wurde wegen zu hoher Cytochrom b Verluste weggelassen. Der Proteingehalt wurde mit der Methode von Markwell et al (1978) durchgeführt, die zu anderen Werten als der Pierce BCA Proteinassay führte. Bei der Präparation wurde die Menge an Dodecylmaltosid (Detergenz), die eingesetzt werden muß, auf der Basis des Proteingehalts errechnet; sie

wurde von der Arbeitsgruppe Trumpower, Hanover USA optimiert und bezieht sich auf die mit der Markwell Methode erhaltenen Proteingehalte.

Alle Schritte bei 4°C durchführen.

- 1) Die submitochondrialen Partikel mit Puffer A (50 mM TRIS pH 8.0, 1 mM MgSO_4 , 1 mM PMSF) auf 15 mg/ml einstellen.
- 2) 0.8 g Dodecylmaltosid/g Protein in Puffer A lösen und zu der rührenden Suspension geben.
- 3) Nach 30 minütigem Rühren 90 Minuten bei 32 000 rpm (100 000 g) im 60 Ti Rotor zentrifugieren.
- 4) Den Überstand mit einer 4 M NaCl Lösung auf 100 mM NaCl bringen und 60 Minuten rühren.
- 5) Den Extrakt auf eine DEAE-Biogel A Säule (Säulenvolumen: 50 ml) geben, die mit Puffer B (50 mM TRIS pH 8.0, 1 mM MgSO_4 , 100 mM NaCl, 0.1 g/l Dodecylmaltosid) equilibriert ist.
- 6) Die Säule über Nacht mit Puffer B waschen und mit einem 100 mM - 300 mM NaCl Gradient (je 100 ml) in Puffer B, fraktioniert eluieren.
- 7) Die Fraktionen mit Hilfe von Redoxdifferenzspektren auf ihre Cytochromgehalte untersuchen und entsprechend vereinigen.
- 8) Die gepoolten Fraktionen auf eine DEAE Sepharose CL 6B Säule (Säulenvolumen 50 ml), die mit Puffer B equilibriert ist, auftragen und die Säule mit einem halben Säulenvolumen waschen.
- 9) Den Komplex III mit einem 100 - 400 mM NaCl (je 100ml) Gradienten in Puffer B fraktioniert eluieren.
- 10) Die Fraktionen aufgrund ihrer Cytochromgehalte poolen und in einer Amicon Zelle mit einer Amicon PM30 Membran einengen. Den konzentrierten Komplex III mit gleichem Volumen Glycerin versetzen, in flüssigem Stickstoff einfrieren und bei -80°C aufbewahren.

2.5. PRÄPARATION VON PLASTOCHINOL PLASTOCYANIN OXIDOREDUKTASE AUS SPINAT:

Der Cytochrom b_6f Komplex aus Spinat wurde wie von Hurt & Hauska (1981) beschrieben mit folgenden Veränderungen isoliert. Die Ammoniumsulfatfällungen wurden von 10-35%, von 35-45% und von 45-60% durchgeführt. Anstelle von Triton X100 wurde 30 mM Octylglucosid verwendet.

2.6. ISOLIERUNG VON PLASTOCYANIN AUS SPINAT:

Plastocyanin wurde für die Aktivitätsmessungen des Cytochrom b_6f Komplex aus Spinat benötigt. Es wurde als physiologischer Elektronenakzeptor in katalytischen Mengen eingesetzt, Plastocyanin gibt die Elektronen an Cytochrom c aus Pferdeherz, dem terminalen Elektronenakzeptor, weiter.

Plastocyanin wurde nach einer Labormethode von W. Haehnel, Münster isoliert:

Alle Schritte im Kühlraum durchführen.

- 1) 5 kg Spinat waschen, entrippen, kaltstellen.
- 2) Spinat in 500 g Portionen mit 700 ml 0.02 M TRICIN/KOH pH 7.6, 0.4 M Saccharose, 0.01 M KCl und 3 g Natriumascorbat im Waring Blendor CB 5 20s mixen.
- 3) Suspension durch einlagige Gaze pressen.
- 4) 10 Minuten bei 5 000 rpm (4 000 g) im GSA zentrifugieren.
- 5) Sedimente mit 250 ml 5 mM TRICIN pH 8.0, 5 mM NaCl/pro 500 g Spinat resuspendieren.
- 6) 5 Minuten bei 9 000 rpm (13 000 g) im GSA zentrifugieren.
- 7) Sediment in 0.02 M TRICIN pH 7.6, 0.01 M KCl (=TK Puffer) aufnehmen, den Chlorophyllgehalt auf 0.5 - 1mg einstellen und bei -20°C einfrieren.
- 8) Die nächsten Portionen in gleicher Weise aufarbeiten.
- 9) Die durchgefrorenen Suspensionen bei Zimmertemperatur auftauen und wieder bei -20°C einfrieren und anschließend in flüssigem Stickstoff durchfrieren.
- 10) Über Nacht im Kühlraum auftauen lassen.
- 11) 15 Minuten bei 2 000 rpm (650 g) GSA zentrifugieren.

- 12) Überstand auf eine 2.5 x 15 cm große DE 52 Säule geben, die mit TK Puffer äquibriert ist.
- 13) Mit Tk Puffer waschen, mit Tk Puffer + 80 mM NaCl waschen und mit einem 80 mM - 230 mM NaCl TK Puffer Gradienten fraktioniert eluieren.
- 14) Fraktionen mit Ferricyanid testen, die blauen Fraktionen poolen und in einer Amicon Zelle mit einer Amicon YM 5 Membran auf 2-4 ml einengen.
- 15) Probe auf eine 2.5 x 80 cm große Sephadex G 75 Säule geben, die mit Tk Puffer equilibriert ist und mit TK Puffer fraktioniert eluieren.
- 16) Reinheitsgrad durch das Verhältnis oD bei 278nm zu oD bei 597nm bestimmen und saubere Fraktionen poolen (ungefähr 1.3). Der Extinktionskoeffizient ist bei 597nm $4.9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Ausbeute betrug $1.4 \text{ } \mu\text{Mole}$.

2.7. ISOLIERUNG VON FERREDOXIN AUS SPINAT:

Ferredoxin wurde nach einer modifizierten Methode von Tagawa & Arnon (1962) isoliert:

Alle Schritte wurden bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

- 1) 8 kg Spinat entripfen, waschen, kaltstellen.
- 2) Durch 3 Walzenmühle mit ungefähr 1 l 0.02 M TRIS pH 8.0 drehen.
- 3) Mit 1-2 l 0.02 M TRIS pH 8.0 im Waring Blendor CB 5 kurz mixen.
- 4) Durch Nylongaze pressen und 1 Stunde ruhen lassen.
- 5) 1. Acetonfällung 0 - 40 %: im Kühlraum im Eis-Salzgemisch Aceton tropfenweise zugeben, dabei mit einem Rührmotor rühren.
- 6) 10 Minuten bei 6 000 rpm (6 100 g) im GS 3 Rotor zentrifugieren.
- 7) 2. Acetonfällung 40 - 75% im -20°C Raum durchführen.
- 8) Im Kühlraum 1 Stunde stehen lassen und den Überstand mit der Wasserstrahlpumpe absaugen.
- 9) 5 Minuten bei 6 000 rpm im GS 3 Rotor zentrifugieren.
- 10) Pellet mit 0.05 M TRIS pH 8.0 aufnehmen und gegen H_2O , mit

TRIS auf pH 8.0 eingestellt, dialysieren.

- 11) Dialysat 30 Minuten bei 20 000 rpm (47 000 g) im SS 34 Rotor zentrifugieren.
 - 12) Auf DE 52 Säule (4 x 18 cm), die mit 50 mM TRIS pH 7.3 equilibriert ist, auftragen.
 - 13) Mit 100 mM TRIS pH 7.3 waschen.
 - 14) Mit 200 mM TRIS pH 7.3 fraktioniert eluieren, in diesen Fraktionen ist Plastocyanin enthalten.
 - 15) Mit einem 0 - 300 mM NaCl Gradienten (je 300 ml) in 200 mM TRIS pH 7.3 Ferredoxin fraktioniert eluieren.
 - 16) Rotbraungefärbte Fraktionen vereinigen, 1:2 mit H₂O verdünnen und auf eine DEAE Sephacel Säule (1.5 x 10 cm), die mit 25 mM TRIS pH 7.3, 150 mM NaCl equilibriert ist, auftragen.
 - 17) Mit einem 150 mM - 300 mM NaCl Gradienten (je 200 ml) in 25 mM TRIS pH 7.3 fraktioniert eluieren.
 - 18) Die Reinheit des Ferredoxins in den Fraktionen durch das Verhältnis OD_{420nm} zu OD_{280nm} bestimmen und so poolen, daß das Verhältnis größer als 0.42 ist.
- Der Extinktionskoeffizient von Ferredoxin ist bei 420 nm 9.5 mM⁻¹ cm⁻¹. Die Ausbeute lag bei 8 µMolen.

2.8. HERSTELLUNG VON SPINATTHYLAKOIDEN:

Spinatthylakoide wurden nach der von Nelson et al (1970) beschriebenen Methode hergestellt.

2.9. PRÄPARATION VON PHOTOSYSTEM II PARTIKELN:

Photosystem II Partikel wurden aus Spinat nach der Methode von Berthold et al (1981) hergestellt.

2.10.ISOLIERUNG VON ANTIMYCIN AUS STREPTOMYCES:

2.10.1.Anzucht der Streptomyceten:

Die Streptomycetenstämme DOM 604 und DOM 609 wurden freundlicherweise von Dr. Dorgerloh (Firma Bayer, Leverkusen) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Streptomyceten fand bei 28°C in einem Rundschüttler bei 280 rpm statt. Die Anzucht von der Agarplatte ausgehend erfolgte 3.5 Tage in Medium 63 in 1000 ml Erlenmeyerkolben, die mit 100 ml gefüllt waren. Zur Gewinnung von Antimycin wurden die Medien 41 und 43 verwendet, die mit 1/10 ihres Volumen mit den in Medium 63 gewachsenen Streptomyceten angeimpft wurden. Für die Isolierung von großen Mengen an Antimycin, das nicht radioaktiv markiert war, wurden die Streptomyces Kulturen nach 3 Tagen geerntet. Bei den Versuchen, die zur radioaktiven Markierung von Antimycin führen sollten, wurden die radioaktiven Verbindungen beim Animpfen mit der Vorkultur zu Medium 41 oder Medium 43 gegeben und die Streptomyceten zu unterschiedlichen Zeiten geerntet.

2.10.2.Isolierung von Antimycin:

- 1) Die Kulturen in 20 ml Portionen mit je 25 ml Chloroform an der Ultraschallspitze bei 100 Watt (Branson Sonifier) in Falcon 50 ml Röhrchen aufbrechen.
- 2) Zur besseren Phasentrennung 5 Min bei 1000 rpm (195 g) in der Hettich Zentrifuge zentrifugieren.
- 3) Chloroformphase abziehen und die Kulturbrühe ein zweites Mal mit Chloroform extrahieren.
- 4) Chloroformphase in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene einengen.
- 5) Rückstand mit einigen ml Chloroform wieder aufnehmen und in einer Vakuumzentrifuge (speed vac) einengen.
- 6) Eingeengte Chloroformphase auf eine DC Kieselgelfolie 60 F 254 mit Fluoreszenzindikator auftragen und in einer mit Laufmittel gesättigten Dünnschichtchromatographiekammer chromatographieren. Als Referenz 10µl 0.2 mM Antimycin-

lösung auftragen. Als Laufmittel Chloroform/ Methanol 9/1, bei einer eventuell nötigen 2. Chromatographie Chloroform/ Methanol 6/4 verwenden. Unter der UV Lampe war Antimycin als fluoreszierende Bande deutlich zu sehen.

Das aus Streptomyceten isolierte Antimycin hatte einen kleineren rf Wert als das bei Sigma oder Boehringer gekaufte.

7) Die Antimycinbande auskratzen und das Kieselgel mit Methanol extrahieren.

2.11.QUANTIFIZIERUNG VON ANTIMYCIN:

a)mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen.

Die fluorimetrische Quantifizierung von Antimycin wurde in Anlehnung an die Methode von Berden & Slater (1972) bei einem Anregungsmaximum von 355 nm und einem Emissionsmaximum von 420 nm durchgeführt.

Für den jeweiligen Messbereich wurde eine Eichkurve am Tag der Messung mit käuflichem Antimycin gemacht. Die fluorimetrische Quantifizierung ist nur bei durch Dünnschichtchromatographie gereinigtem Antimycin möglich.

b)mit Hilfe eines Bioassay

Die Kulturbrühe wurde mit doppeltem Volumen an Methanol versetzt, an der Ultraschallspitze homogenisiert und 5 Minuten bei 14 000 rpm (16 000 g) in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Elektronentransport von Rinderherzmitochondrien wurde an der O₂ Elektrode mit NADH als Elektronendonator gemessen; die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch den Überstand der extrahierten Streptomyceten korrelierte mit der Antimycinkonzentration und konnte mit Hilfe der Antimycinhemmkurve abgeschätzt werden.

Diese Methode war die schnellste und einfachste und konnte deswegen sehr gut für die Beobachtung des Verlaufs der Antimycinsynthese angewendet werden; man erhält aber nur relative Werte, eine genaue Quantifizierung ist damit nicht möglich.

c) mit HPLC

Für die Quantifizierung mit HPLC wurde die Kulturbrühe mit 2 fachem Volumen Methanol an der Ultraschallspitze extrahiert und 5 Minuten bei 14 000 rpm (16 000 g) in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine kleine Kieselgelsäule (Pasteurpipette), die mit Methanol equilibriert war, gegeben und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde über einen $0.5\ \mu\text{m}$ Filter gereinigt.

Die HPLC Bedingungen wurden von Dr. Dorgerloh (Bayer AG) übernommen:

Verwendete Säule: reversed phase 18, $5\ \mu\text{m}$, 125 mm lang
(Nucleosil 100 5 C 18 von Chromatographie Service Eschweiler)

Laufmittel A: Methanol

Laufmittel B: (2 Teile 50 mM NaH_2PO_4 + 1 Teil HClO_4) + 30%
Methanol

Es wurde folgender Gradient gefahren:

0 Minuten: 64% Methanol, 36 % Laufmittel B
linearer Gradient

9 Minuten: 99,9 % Methanol, 0,1 % Laufmittel B
isokratisch

11 Minuten: 99,9 % Methanol, 0,1 % Laufmittel B
linearer Gradient

12 Minuten: 64 % Methanol, 36 % Laufmittel B

Die Fließmittelgeschwindigkeit betrug $0.75\ \text{ml/Minute}$ und die Detektion erfolgte bei 230 nm.

Der durch den Laufmittelgradienten verursachte Drift der Basislinie wurde mit einem Integrator abgespeichert und bei der Integration der Antimycinpeaks verrechnet.

Die Quantifizierung mit HPLC wurde nicht routinemäßig eingesetzt, diente aber zur Überprüfung der Fluoreszenzsergebnisse und ermöglichte darüberhinaus die Charakterisierung der Antimycinisomere.

d) mit Spektrophotometrie

Es wurde ein Spektrum der ethanolischen Antimycinlösung von 220 - 400 nm aufgenommen und Konzentration von Antimycin mit einem Extinktionskoeffizienten von $4.8\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt.

2.12.BESTIMMUNG DER CYTOCHROMGEHALTE:

Die Cytochromgehalte wurden mit Redoxdifferenzspektren bestimmt. Die Reduktion erfolgte mit Natriumdithionit, die Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat (III). Für Cytochrom b_6 aus Spinat wurde ein Extinktionskoeffizient von $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 563 nm, für Cytochrom f aus Spinat ein Extinktionskoeffizient von 19 bei 551 nm, für Cytochrom b aus Rind und aus Hefe ein Extinktionskoeffizient von $28,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 562 nm verwendet. Da die Extinktionskoeffizienten für ein Mol Häm bestimmt wurden, Cytochrom b aber nach neueren Erkenntnissen zwei Hämgruppen trägt, wird in der vorliegenden Arbeit der Cytochrom b Gehalt als Mol Cytochrom b-Häm angegeben.

2.13.FERREDOXIN ABHÄNGIGE ZYKLISCHE PHOTOPHOSPHORYLIERUNG:

Die Ferredoxin abhängige zyklische Photophosphorylierung wurde wie von Hartung (1985) beschrieben durchgeführt. Die ATP Bildung wurde mit dem Luciferin Luciferase System bestimmt. Die gebildeten Mole ATP wurden nach folgender Formel berechnet: $(\text{mV Probe} : [\text{mV Probe} + \text{Standard}] - \text{mV Probe}) \times \text{mV Standard}$ aus der Eichkurve. Anaerobe Bedingungen wurden durch 10 mM Glucose, 23 U/ml Glucoseoxidase und 1000 U/ml Katalase gewährleistet. Das 'Poising' erfolgte entweder durch einminütige Vorbelichtung und darauffolgende Zugabe von $0.75 \mu\text{M}$ DCMU oder durch das von Hartung (1985) beschriebene Hydrogenase/ H_2 System. Die Photophosphorylierung fand bei 120 W/m^2 mit einem Rotfilter statt.

2.14.PMS ABHÄNGIGE ZYKLISCHE PHOTOPHOSPHORYLIERUNG:

Der Reaktionsansatz enthielt: 3.25 mM MgCl_2 , 2.5 mM NaH_2PO_4 , 20 mM KCl, 0.5 mM ADP, 27 mM TRICIN pH 8.0, 20 μM Diadenosin-pentaphosphat, 2 mM Ascorbat, 0.2 mM PMS, Spinatthylakoide 50 μg Chlorophyll/ml, 1 μM DCMU. Die PMS zyklische Photophosphorylierung wurde unter aeroben Bedingungen bei 20°C

und 1000 Watt/m² Lichtstärke mit einem Rotfilter durchgeführt. Die sonstigen Versuchsbedingungen entsprachen denen bei der Ferredoxin abhängigen zyklischen Photophosphorylierung.

2.15. MESSUNG DES RESPIRATORISCHEN ELEKTRONENTRANSPORTS:

Der respiratorische Elektronentransport wurde an einer Clark Sauerstoffelektrode bei 30°C gemessen. Bei Hemmstoffversuchen betrug die Methanolkonzentration maximal 1%.

Der Testpuffer für die Messungen mit Rinderherzmitochondrien enthielt:

250 mM Saccharose
10 mM Phosphat pH 7.2
5 mM MgCl₂
20 mM KCl
20 mM TRIS pH 7.4
0.5 mM NADH

eine 100 - 350 µg Protein entsprechende Menge Rinderherzmitochondrien.

Der Testpuffer für die Messungen mit Hefemitochondrien enthielt:

650 mM Sorbitol
10 mM KH₂PO₄
10 mM TRIS pH 6.5
10 mM KCl
2 mM MgCl₂
0.5 mM NADH
(0.5 mM ADP)

eine 100 - 350 µg Protein entsprechenden Menge Hefemitochondrien.

Die Mitochondrien wurden auf ihre Kopplung durch Zugabe von einer limitierenden Menge ADP getestet und der respiratorische Quotient nach Estabrook (1967) ermittelt.

2.16. BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON CYTOCHROM bc KOMPLEXEN:

Die Aktivitäten der bc Komplexe wurden an einem Zweistrahlphotometer (Sigma ZWSII) bei 20°C gemessen. Cytochrom c stellte

dabei den terminalen Elektronenakzeptor. Die Reduktion von Cytochrom c wurde bei 550 nm gegen 540 nm, den isobestischen Punkt von Cytochrom c gemessen. Zur Berechnung der Aktivität wurde ein Extinktionskoeffizient für Cytochrom c von $17 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet. Die Aktivität des Cytochrom b₆f Komplex aus Spinat wurde in folgendem Reaktionsmedium gemessen:

30 mM MES pH 6.5

0.4 μM Plastocyanin

10 μM Cytochrom c (aus Pferdeherz)

50 μM 2,5 ditert.butylhydrochinon (als Elektronendonator)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20 nM b₆f Komplex gestartet.

Das Reaktionsmedium für die Messungen mit den Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktasen aus Rind und Hefe enthielt:

50 mM Phosphat pH 7.2

250 mM Saccharose

0.2 mM EDTA

100 μM Cytochrom c

2 mM KCN (hemmt eventuell vorhandene Cytochromoxidase)

15 μM Ubiquinol 2 (als Elektronendonator)

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 nM Complex III gestartet.

2.17. STEADY STATE MESSUNGEN AN BC1 KOMPLEXEN AUS RIND UND HEFE

Die steady state Messungen wurden bei 20°C an einem Zweistrahl-photometer (Sigma ZWSII) durchgeführt. Die Reduktion des Cytochrom b wurde bei dem Wellenlängenpaar 562 nm/577 nm gemessen. Das Reaktionsmedium setzte sich wie folgt zusammen:

125 mM Saccharose

25 mM Phosphat pH 7.2

1 mM KCN

0.1 mM EDTA

1.5 μM Komplex III

Die bc Komplexe wurden mit 0.6 μM Ferricyanid voroxidiert, und die Reaktion mit 0.1 mM Ubiquinol 2 gestartet. Für die 'oxidant - induced reduktion' wurde 16 μM Ferricyanid zugefügt. Bei

Hemmstoffversuchen wurde 15 Sekunden mit dem Hemmstoff inkubiert, bevor die zu hemmende Reaktion mit Ferricyanid oder mit Ubiquinol gestartet wurde.

2.18. PROTEINBESTIMMUNGEN:

Die Proteinbestimmungen bei der Complex III Präparation aus Hefe erfolgte nach Markwell et al (1978) modifiziert.

Markwell Proteinbestimmung:

Reagenz A: 2% Na_2CO_3 , 0.4% NaOH, 1% SDS,
0.2% NaKTartrat x $4\text{H}_2\text{O}$

Reagenz B: 4% CuSO_4 x $5\text{H}_2\text{O}$

Reagenz C: 99 Teile A + 1 Teil B

1) 200 μl Probe mit 1 ml Reagenz C 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

2) 100 μl Phenolreagenz dazugeben.

3) 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

4) Extinktion bei 660 nm oder bei 750 nm bestimmen.

Alle anderen Proteinbestimmungen erfolgten mit dem Pierce BCA Proteinassay bei 37°C und 15 Minuten Inkubationszeit nach Vorschrift des Herstellers.

2.19. CHLOROPHYLLBESTIMMUNG:

Der Chlorophyllgehalt wurde bei 652 nm nach Arnon (1949) bestimmt.

2.20. BINDUNGSEXPERIMENTE:

Mit Hilfe von Bindungeexperimenten wurde die Bindung von radioaktiv markierten Hemmstoffen an Organellen oder an isolierten Proteinkomplexen untersucht. Die gebundenen und die freien Hemmstoffmoleküle wurden nach Abtrennung der Organellen oder der Komplexe von dem Reaktionsmedium durch Zählen der

Radioaktivität bestimmt. In einem Gläschen mit Szintillationsflüssigkeit ohne Probe wurde der Background bestimmt und abgezogen.

2.20.1. Mit Mitochondrien und Thylakoiden:

In 2 ml Reaktionsvolumen wurden Mitochondrien (eine 0.1 -0.25 nmol Cytochrom b entsprechende Menge) oder Spinatthylakoide (eine 50 µg Chlorophyll entsprechende Menge) mit unterschiedlichen Mengen radioaktiv markiertem Hemmstoff für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionsmedien waren unterschiedlich und sind im Ergebnisteil angegeben. Anschließend wurden die Ansätze bei 10 000 g (11 500 rpm) in einer Eppendorfzentrifuge zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde für die Bestimmung des ungebundenen Hemmstoffs entnommen und im Szintillationszähler gezählt. Das Pellet wurde mit 1 ml Reaktionspuffer an der Ultraschallspitze solubilisiert und gezählt.

2.20.2. Mit Photosystem II Partikeln:

125 µg Chlorophyll entsprechende Mengen Photosystem II Partikel wurden in 2 ml 250 mM Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl₂ mit unterschiedlichen Mengen [³H]-Antimycin 10 Minuten inkubiert, 3 ml Reaktionsmedium wurden zugefügt und die Proben wurden 1 h 20 Min bei 67 000 rpm (510 000 g) im Vertikalrotor RP 67V zentrifugiert. 1 ml Überstand wurde entnommen und gezählt, das Pellet wurde mit 1 ml Reaktionsmedium solubilisiert und gezählt.

2.20.3. Mit Photosystem I Vesikeln

Die Photosystem I Vesikel wurden zusammen mit Dr.K.Krab in Amsterdam präpariert. 50 µg Chlorophyll entsprechende Menge wurde in 2 ml 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die PS I Vesikel wurden während einer 1 stündigen Zentrifugation im

SW 60 Ti bei 60 000 rpm (485 000g) pelletiert. 1 ml des Überstandes und das in 1 ml Reaktionspuffer aufgenommene und an der Ultraschallspitze solubilisierter Pellet wurden gezählt.

2.20.4. Mit Cytochrom bc Komplexen:

0.8-3 nMole Cytochrom bc_1 oder b_6f Komplex wurden in 2 ml 50 mM TRIS pH 7.4 mit unterschiedlichen Mengen radioaktiv markiertem Hemmstoff 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 3 ml Reaktionsmedium wurden zugegeben und die Proben wurden 1 Std 20 Min. bei 67 000 rpm (510 00 g) im Vertikalrotor RP 67V zentrifugiert.

1 ml vom Überstand wurden gezählt, 3 ml Überstand wurden verworfen und das Pellet mit 1 ml des Überstandes an der Ultraschallspitze solubilisiert und gezählt. Ein vollständiges Abnehmen des Überstandes war nicht möglich, da das an der Wand liegende Pellet während der Entnahme zusammenfiel und dann nicht mehr sauber vom Überstand getrennt werden konnte.

2.21. VERDRÄNGUNGEN:

Verdrängungsexperimente können darüber Auskunft geben, ob zwei Hemmstoffe dieselbe oder eine überlappende oder eine ganz unterschiedliche Bindungsnische haben. Mitochondrien, Thylakoide oder Photosystem II partikel wurden 10 Minuten mit dem ersten Hemmstoff inkubiert, der zweite Hemmstoff wurde zugefügt und nach weiteren 10 Minuten wurde die Zentrifugation gestartet. Einer der beiden Hemmstoffe war radioaktiv markiert und wurde in einer konstanten Konzentration eingesetzt, die Konzentration des anderen, nicht markierten Hemmstoffs wurde variiert. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen der Bindungsexperimente.

2.22. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNGEN:

Mitochondrien oder Cytochrom bc₁ Komplexe wurden mit [¹⁴C]-Azido-Monuron oder mit [¹⁴C]-Azido-plastochinon 5 Minuten im Dunkeln im Eis inkubiert. Die Proben wurden in einer Quarzkapillare unter Argon im Eiswasserbad 10 Minuten belichtet. Als Lichtquelle diente bei [¹⁴C]Azido-plastochinon Markierungen eine 2000 Watt Photolampe mit $2.5 \times 10^6 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Lampenabstand 40 cm), bei [¹⁴C]-Azido-Monuron Markierungen eine UV Lampe mit $5 \times 10^4 \text{ erg} \times \text{cm}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (Lampenabstand 30 cm). Nach der Belichtung wurden die Proben in Gelprobenpuffer aufgenommen und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung auf Eis oder bei -20°C aufbewahrt. Die SDS Polyacrylamidgele wurden mit Coomassie angefärbt und fotografiert. Die β -Strahlung der [¹⁴C] markierten Proteinbanden im Gel ist zu schwach für eine direkte Schwärzung der Röntgenfilms. Die Gele wurden deswegen 1 Stunde mit Amplifier, einem Szintillator, inkubiert und nach Auflegen auf Whatman 3 Papier getrocknet. Ein Röntgenfilm wurde mit einem Photoblitzz aus 1 m Entfernung vorgeblitzt und 1-5 Wochen bei -80°C exponiert.

2.23. POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE:

a) 11-15 % Gradientengel nach Chua (1980)

Die 11 - 15 % Gradientengele hatten eine Dicke von 2 mm und eine Größe von 20cm x 30cm. Sie wurden mit 220 Volt 1 Stunde und dann mit 160 Volt gefahren, bis Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreicht hatte. Die 15 % Minigele wurden in einer Hoefer Scientific Instruments SE 250 Kammer bei konstant 250 Volt laufen gelassen und hatten eine Größe von 6.2 cm x 8.2cm. Der Gelprobenpuffer hatte folgende Zusammensetzung:

60 mM HEPES pH 7.5

2 % SDS

10 % Glycerin

Unmittelbar vor dem Gebrauch wurde dem Gelpuffer Mercaptoethanol in einer Endkonzentration von 5% zugefügt.

b) 16 % SDS Polyacrylamidgel

Die 16 % Gele wurden nach der Methode von Schagger et al (1985) durchgeführt. Die Gele hatten eine Größe von 20 x 30 cm. Dieses Gelsystem eignet sich besonders für die Auftrennung von kleinen Peptiden wie zum Beispiel den kleinen Untereinheiten von Cytochrom bc₁ Komplexen.

Die Cytochromfrbung erfolgte nach der Methode von Thomas et al (1976). Das Färben und Entfärben der Gele wurde nach Chua (1980) durchgeführt.

2.24. SEQUENZIERUNG DER 30 KD BANDE DES CYTOCHROM BC₁ KOMPLEX AUS HEFE:

Cytochrom bc₁ Komplex (2.7 mg Protein) wurde in einem präparativen 16 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die 30 kD Bande, die in den DCMU-Photoaffinittsmarkierungsexperimenten markiert wurde, wurde ausgeschnitten und in sterilem H₂O gewaschen, bis der pH 5.5. betrug. Das in der Bande enthaltene Protein wurde in einer Elutionskammer ca. 14 Stunden elektroeluiert.

Elutionspuffer: 0.01 % SDS, 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat
Die nach der Elektroelution erhaltene Probe wurde über Nacht in einer Speed vac Zentrifuge lyophilisiert. Die Peptid-Sequenzanalyse wurde von Herrn Dr. H. Meyer, Bochum durchgeführt.

2.25. IMMUNOBLOTS:

Die Durchführung der Immunoblots erfolgte nach der Methode von Towbin et al (1979). Nach der elektrophoretischen Auftrennung im 11-15 % Gradientengel nach Chua (1980) oder im 16 % Gel nach Schägger et al (1985) wurden die Proteine in einer 13.5 l Blotkammer auf Nitrocellulose bei 500 mA während 3 Stunden transferiert. Die 15 % Minigele nach Chua (1980) wurden in einer 'fast blot' Kammer bei 2.5 mA/cm² zwischen zwei Graphitplatten 40 Minuten lang geblottet. Das Gel und die Nitrocellulose lagen dabei zwischen je 3 Lagen Whatman 3

Papier, das mit Fast Blot Puffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 10 % Methanol pH 8.3) getränkt war.

2.26. SYNTHESE VON AZIDO-ANTIMYCIN:

Aus Antimycin wurde Deformylantimycin nach der Methode von Tamelen et al (1961) synthetisiert. Die Synthese von Deformamidoazidoantimycin erfolgte wie von Ho et al (1985) beschrieben.

2.27. SYNTHESE VON UBIQUINOL 2

Die Synthese von Ubiquinon 2 erfolgte nach der Methode von Scott (1965). Ubiquinon 2 wurde nach einer Labormethode von E. Berry, Hanover USA reduziert.

- 1) Alle Schritte unter N_2 Begasung durchführen!
- 2) 1 ml 72.8 mM Ubichinon 2 (in Ethanol) mit 1 ml 0.1 M KH_2PO_4 pH 5.0 mischen, kleine Mengen an $Na_2S_2O_4$ unter N_2 zugeben und mischen, bis keine weitere Bleichung mehr stattfindet.
- 3) Eine Spatelspitze $NaBH_4$ zugeben.
- 4) 3x mit 1 ml Pentan, Hexan oder Cyclohexan extrahieren.
- 5) Extrakte vereinigen und mit Na_2SO_4 trocknen und in 3.62 ml DMSO mit 6mM HCl lösen; (Endkonzentration = 20 mM).
- 6) Unter N_2 bei $-20^\circ C$ aufheben.

2.28. SYNTHESE VON SALICYLSÄUREAMIDDERIVATE:

Die Synthese der Salicylsäureamidderivate erfolgte nach der Methode von Wilson et al (1985). Für die Synthese von 2-Chlor-4-nitrosalicyloctadecylamid wurde zunächst 5-Chlor-3-nitrosalicylsäure nach der Methode von Lin et al (1978) synthetisiert. Die Synthese von 2-Chlor-4-nitrosalicyloctadecylamid erfolgte ebenfalls nach der Methode von Wilson et al (1985).

2.29. KULTURMEDIEN UND AGAR:

2.29.1. Medium zur Anzucht von Saccharomyces cerevisiae

20 g Hefeextrakt/l

2 g KH_2PO_4 /l2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ /l

Nach 75 minütigem Autoklavieren wurden 10 ml/l sterile 10 % Glucose und 30 ml Ethanol/l zugegeben.

2.29.2. Medien zur Anzucht von Streptomyces (nach Dr. Dorgerloh, Bayer AG)

Medium 63:

- 20 g Stärke/l
- 10 g Glucose/l
- 5 g N-Z-Amine Typ A/l
- 10 g Hefeautolysat (Ohly)/l

Mit 10 % Na_2CO_3 pH 7.2 einstellen, dann 4 g CaCO_3 zugeben

Medium 41:

- 30 g Sojamehl/l
- 30 g Glycerin/l
- 2 g CaCO_3 /l

Der pH muß bei diesem Medium nicht eingestellt werden.

Medium 43:

- 40 g Mannit/l
- 5 g L-Arginin-hydrochlorid/l
- 2 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ /l
- 0.5 g KH_2PO_4 /l
- 1 g NaCl /l
- 0.5 g Bacto-Hefeextrakt/l
- 0.2 Vol% Spurenelementelösung

Der pH wurde auf 7.0 eingestellt.

Spurenelementelösung:

5 g EDTA
 2 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0.1 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
 0.03 g $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
 0.3 g H_3BO_3
 0.2 g $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
 0.01 g $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
 0.02 g $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
 0.03 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

In 1000 ml H_2O lösen und auf pH 3-4 einstellen.

2.29.3. Festagar zur Stammerhaltung der Hefen und der Streptomyceten:

5 g Hefeextrakt/l
 10 g Pepton/l
 5 g Glucose/l
 5 g NaCl /l
 20 g Agar/l

Auf pH 7.0 einstellen, Agar durch Erwärmen lösen, 20 Minuten bei 121°C autoklavieren.

2.30. GERÄTE UND CHEMIKALIEN:

2.30.1. Geräte:

Branson Sonifier B-12
 Biometra Fast Blot 5
 Bio-Trap Elutionskammer
 Hedler Fotolampe De Luxe 2000
 New Brunswick Gyrotory Model G76 (Rundschüttler)
 Dynamill, Zelmühle, Bachofen, Basel
 Shimadzu Spectrofluorophotometer RF 510
 Kontron Uvikon 820 Spektrophotometer
 Sigma ZWS II (Zweiwellenlängenphotometer)
 LKB 1250 Luminometer
 LKB 1219 Liquidscintillationcounter

Sorvall Omnimixer (Mixer für kleine Mengen Spinat)
 Waring Blender CB 5 (Mixer für Rinderherz und große Mengen Spinat)

HPLC: Kontron LC Pump 410
 Kontron Programmer Series 200
 Uvikon 720 LC Kontron
 Shimadzu C-R3 A Chromtopac

Zentrifugen:

Sorvall RC 2B
 Eppendorf 5415
 Beckman L8-70M
 Hettich Roto Silenta II

2.30.2. Chemikalien:

a) für western blots:

Goat anti Rabbit igG Horseradish Peroxidase Conjugate, Biorad
 HPR Color Development Reagent, Biorad
 Nitrocellulose, Biorad
 Filterpapier 3, Whatman

b) Säulenmaterialien:

DEAE Sepharose CL6B, Pharmacia
 Sepharose CL6B, Pharmacia
 Biogel HTP (Hydroxyapatit), Biorad
 DEAE 52, Whatman

c) Detergenzien:

Triton x100 für Szintillationstechnik. Serva
 n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (Octylglucosid), Sigma
 Dodecyl- β -D-Maltosid, Calbiochem

d) Radiochemikalien:

L-[G- 3 H]Tryptophan, 215 GBq/mMol, Amersham
 [3- 3 H]Methionin, 1235 GBq/mMol, Amersham
 Azido[methyl- 14 C]-Monuron, 2.18 GBq/mMol, Amersham
 Azido[methyl- 14 C]-Monuron, 37 MBq/mMol, Boschetti A., Bern
 [methyl- 14 C]-Diuron, 2.11 GBq/mMol, Amersham

[^{14}C]-Plastochinon-Azid, 429 MBq/mMol, Masson K. & Oettmeier W., Bochum

D-[^{14}C]Mannitol, 2.07 GBq/mMol, Amersham

L-[U- ^{14}C]Leucin, 12.7GBq/mMol, Amersham

[2- ^{14}C]Acetat, 2.07 GBq/mMol, Amersham

L-[U- ^{14}C]Phenylalanin, 19 Gbq/mMol, Amersham

e) Inhibitoren:

Antimycin A, Boehringer, Sigma

HQNO, Myxothiazol, Sigma

Aurachine und Stigmatellin wurden freundlicherweise von Dr. Höfele, GBF, Braunschweig zur Verfügung gestellt.

f) Sonstiges:

Cytochrom c (aus Perdeherz), Sigma

Röntgenfilm: Hyperfilm MP, Amersham

Amplifier, Amersham

1243-102 ATP Monitoring Kit, LKB

Zymolyase-20 T von *Arthrobacter luteus*, Hersteller: Seikagaku Kogyo Co., LTD., 2-9 Nihonbashi-Noncho, Chuo-Ku, Tokyo, 103 Japan

Ubichinon 2, Masson & Oettmeier, Bochum

Die Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von Boehringer, Merck, Serva, Roth, Aldrich, Sigma oder Fluka.

3. ERGEBNISSE:

Zur Charakterisierung einer Hemmstoffbindestelle eignen sich Bindungsstudien, Photoaffinitätsmarkierungen und Untersuchungen darüber, welche Enzymaktivität gehemmt wird. Die Bindungskonstante K_B , die Auskunft über die Affinität der Bindestelle gegenüber dem Hemmstoff gibt und die Anzahl der Bindestellen bezogen z.B. auf mg Protein können durch Bindungsexperimente ermittelt werden. Dabei werden die an Mitochondrien oder Thylakoide oder an isolierte Komplexe gebundenen und die freien radioaktiven Hemmstoffmoleküle bestimmt. Antimycin und viele andere Hemmstoffe binden nicht kovalent an ihre Bindestelle. Möchte man wissen, an welche Untereinheit des Proteinkomplexes der Hemmstoff bindet, muß der Hemmstoff so verändert werden, daß er vor der gelelektrophoretischen Auftrennung der Untereinheiten kovalent an seine Bindestelle gebunden ist. Bei der Photoaffinitätsmarkierung wird zu diesem Zweck eine Azidogruppe in den Hemmstoff eingeführt. Unter Lichteinfluss wird N_2 abgespalten, ein Nitren entsteht und bindet an ein in der unmittelbaren Nähe befindliches Nucleophil. Somit wird der Hemmstoff in seiner Bindungsnische oder in dessen Nähe kovalent gebunden und markiert damit die Untereinheit, die an seiner Bindung beteiligt ist. Die markierte Untereinheit kann dann isoliert werden. Durch eine Peptidsequenzierung können jene Aminosäuren identifiziert werden, die den Hemmstoffen kovalent gebunden haben. Zunächst sollen die Organellen und Proteinkomplexe, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, charakterisiert werden.

3.1. CHARAKTERISIERUNG DER ORGANELLEN UND PROTEINKOMPLEXE:

3.1.1. RINDERHERZMITOCHONDRIEN:

Mitochondrien aus Rinderherz wurden nach einer modifizierten Methode von Smith (1967) präpariert. Die Aktivität der Mitochondrien wurde an einer Clark Sauerstoffelektrode bestimmt. Mit NADH als Elektronendonator verbrauchten die Mitochondrien bei

30°C 15 $\mu\text{Mole O}_2 \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Stunde}^{-1}$. Der respiratorische Quotient, der Auskunft über die Kopplung der Mitochondrien gibt, wurde bestimmt, indem der Sauerstoffverbrauch in Ab- und in Anwesenheit von ADP bestimmt wurde. Der respiratorische Quotient betrug 2.3. Ein Redoxdifferenzspektrum gibt Abb. 2 wieder, die Bande von Cytochrom c_1 und c sind bei 553 nm, die von Cytochrom b bei 562 nm zu erkennen. Bei 610 nm absorbieren die Cytochrome a und a_3 der Cytochromoxidase. Pro mg Protein enthielten die Mitochondrien 0.54 nMole Cytochrom b -Häm.

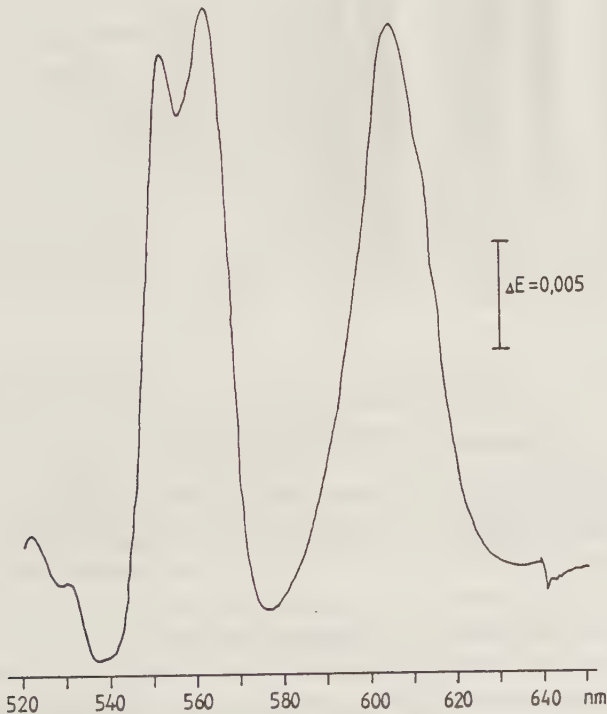


Abb. 2: Redoxdifferenzspektrum von Rinderherzmitochondrien, Probe mit Dithionit reduziert gegen Probe mit Ferricyanid oxidiert gemessen, je 1.9 mg mitochondriales Protein/ml.

Die Proteine der Rinderherzmitochondrien wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und sind in Abb. 3 dargestellt. Die Methode nach Smith ermöglicht die Aufarbeitung eines Rinderherzes an einem Tag, man erhält ungefähr 4.5 g mitochondriales Protein/Herz. Zwei Präparationen genügen als Ausgangsmaterial für eine Komplex III Präparation.

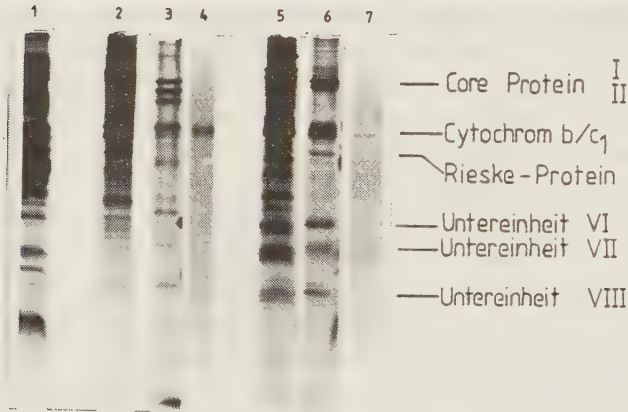


Abb. 3: Proteinmuster im 16% SDS-PAGE von 1=Spinatthylakoide, 2=Hefemitochondrien, 3=Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe, 4=Hämfärbung des Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe, 5=Rindmitochondrien, 6=Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind, 7=Hämfärbung des Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind

3.1.2.CYTOCHROM bc₁ KOMPLEX AUS RIND:

Der Cytochrom bc₁ Komplex aus Rinderherzmitochondrien wurde wie von Engel et al (1980) beschrieben präpariert. Das Proteinmuster, das man nach gelektrophoretischer Auftrennung erhält, ist in Abb. 3 abgebildet. Mit der Hämfärbung erhält man nur eine Bande. Wahrscheinlich sind die nicht kovalent gebundenen Häme im Cytochrom b verloren gegangen, so daß nur das kovalent

gebundene Häm des Cytochrom c_1 angefärbt wird. Die Proteinbanden sind in Anlehnung an die Dissertationsarbeit von Engel (1983), der das gleiche Proteinmuster beschreibt, beschriftet. Ein Redoxdifferenzspektrum ist in Abb. 4 dargestellt.

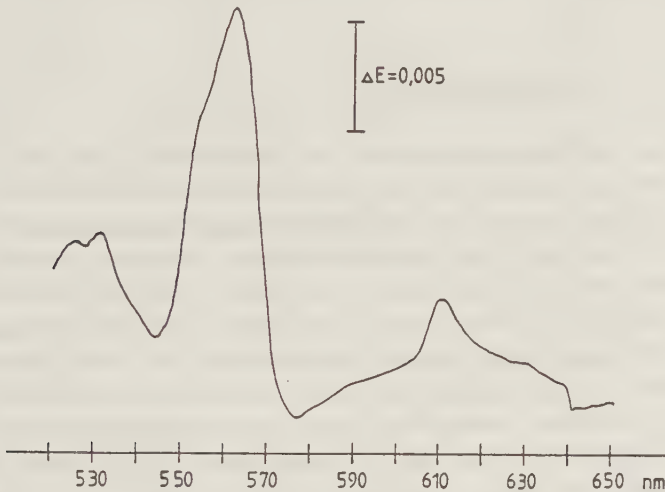


Abb. 4: Redoxdifferenzspektrum vom Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind. Probe mit Dithionit reduziert gegen Probe mit Ferricyanid oxidiert gemessen.

Man erkennt deutlich ein Absorptionsmaximum bei 562 nm, die Bande von Cytochrom b , die Schulter dieses Peaks beruht auf dem Absorptionsmaximum von Cytochrom c_1 , der kleine Peak bei 610 nm deutet auf eine leichte Verunreinigung durch die Cytochrom-oxidase hin. Auf 1 mg Protein kamen im Cytochrom bc_1 Komplex 4.6 nMole Cytochrome b -Häm (bei einem Extinktionskoeffizienten von $28.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Die Ubichinol-Cytochrom- c -Oxidoreduktaseaktivität wurde als Reduktion von Cytochrom c (aus Pferdeherz) bei 550 nm gegen 540 nm, dem isobestischen Punkt, an einem Zweiwellenlängenphotometer mit Ubichinol 2 als Elektronendonator gemessen. Die Oxidoreduktaseaktivität entspricht mit 755 μMol Cytochrom c pro nMol Cytochrom b -Häm und

Stunde oder, bezogen auf Protein, mit 37 U pro mg Protein den Ergebnissen von Engel (1983). Diese Rate wurde in Anwesenheit von 1 mM KCN, welches die Cytochromoxidase hemmt, gemessen und war deutlich höher als in dessen Abwesenheit. Dies bestätigt die Vermutung, das eine geringe Verunreinigung durch Cytochromoxidase vorliegt.

3.1.3. HEFEMITOCHONDRIEN:

Es wurden Mitochondrien sowohl aus Bäckerhefe, die von Uniform, Werne bezogen wurde, als auch aus selbst gezogener Hefe isoliert. Zur Anzucht wurden Saccharomyces cerevisiae KL 14-4A W' als Wildtyp und der Diuron resistente Stamm KL 14-4A Diu 2-766 verwendet (Di Rago et al 1986). In der DCMU resistenten Mutante KL 14-4A ist im Cytochrom b die Aminosäure 17 Isoleucin gegen Phenylalanin ausgetauscht. Bei der Isolierung von Mitochondrien müssen die Hefezellen zunächst aufgebrochen werden. Dies kann einmal durch enzymatisches Abbauen der Zellwand geschehen oder durch mechanisches Zertrümmern der Zellwand mit Hilfe von Glasperlen, die in der Zellsuspension bewegt werden (Dynomill).

a) Mitochondrien aus gekaufter Hefe präpariert mit der Dynomill:

Der O_2 Verbrauch mit NADH als Elektronendonator wurde an einer Clark Sauerstoffelektrode verfolgt und betrug bei 30°C $7.6 \mu\text{Mole } O_2 \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Stunde}^{-1}$. Der O_2 Verbrauch war in An- und Abwesenheit von ADP gleich. Daraus folgt, daß die mit der Dynomill präparierten Mitochondrien nicht gekoppelt waren. Ein Redoxdifferenzspektrum ist in Abb. 5 abgebildet. Man erkennt bei 562 nm die Bande von Cytochrom b, bei 605 nm die von Cytochrom a und a_3 der Cytochromoxidase. Das Absorptionsmaximum von Cytochrom c_1 ist als Schulter des Cytochroms b zu erkennen. Das nach gelelektrophoretischer Auftrennung erhaltene Proteinmuster der Hefemitochondrien ist in Abb. 3 dargestellt.

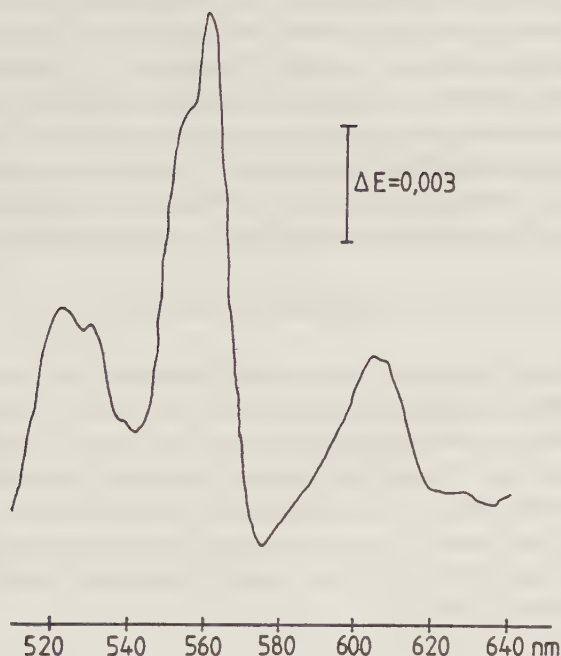


Abb. 5: Redoxdifferenzspektrum von Hefemitochondrien, Probe mit Dithionit reduziert gegen Probe mit Ferricyanid oxidiert gemessen, 1.5 mg mitochondriales Protein/ml.

b) Mitochondrien aus den Hefestämmen Kl 14-4A W⁺ und Diu 2-766:

Die Proteinmuster nach gelelektrophoretischer Auftrennung und die Redoxdifferenzspektren der Mitochondrien aus den Hefestämmen Kl 14-4A W⁺ und Diu 2-766 unterscheiden sich nicht von denen, die man bei Mitochondrien aus gekaufter Hefe erhält. Dies traf sowohl für die Mitochondrien zu, die mit der Dynomill Methode isoliert wurden als auch für die, bei deren Präparation die Zellwände enzymatisch abgedaut wurden.

Präparation mit der Dynamill Methode:

Der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien aus den Hefestämmen Kl 14-4A W⁺ und Diu 2-766, die mit der Dynamillmethode präpariert wurden, lag mit $3.5 \mu\text{Mole O}_2 \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Stunde}^{-1}$ (NADH als Elektronendonator) deutlich unter dem der Mitochondrien aus gekaufter Hefe. Der respiratorische Elektronentransport war entkoppelt. Das nMole Cytochrom b-Häm zu mg Protein Verhältnis betrug 0.23 und war damit etwas schlechter als das bei den Mitochondrien aus gekaufter Hefe.

Präparation mit enzymatischer Methode:

Der respiratorische Elektronentransport der Mitochondrien aus den Hefestämmen Kl 14 4A W⁺ und Diu 2-766, deren Zellen enzymatisch aufgebrochen wurden, hatte mit $9 \mu\text{Molen O}_2$ pro mg Protein und Stunde die höchste Rate der hier präparierten Mitochondrien. Dabei wurde NADH als Elektronendonator eingesetzt. Der respiratorische Quotient dieser gekoppelten Mitochondrien betrug bei NADH 2.6. Das nMole Cytochrom b-Häm zu mg Protein Verhältnis war 0.24.

Tabelle 1: Vergleich der Mitochondrien aus den Hefestämmen Kl 14-4A W⁺ und Diu 2-766 und aus gekaufter Hefe. Die Präparation erfolgte entweder mit der Dynamill Methode oder mit der enzymatischen Methode. Die Ausbeuten geben die Menge an mitochondrialen Protein wieder, die bei einer Präparation erhalten wurden. Die Aktivität des respiratorischen Elektronentransports ist in $\mu\text{Mole O}_2 \times \text{mg Protein}^{-1} \times \text{Stunde}^{-1}$ angegeben. NADH diente als Elektronendonator.

	D Y N O M I L L		ENZYMATISCH
	Hefe gekauft	Kl 14-4a W ⁺ / Diu 2-766	KL 14-4A W ⁺ / Diu 2-766
Ausgangs-	1000 g	10 l Kultur	1.7 l Kultur
material	gepreßte Zellen		
Ausbeute	2.8 g	180 mg	10 mg
nMol Cytb-H./	0.3	0.23	0.24
mg Protein			
Aktivität	7.6	3.5	9
Kopplung	-	-	+

3.1.4. CYTOCHROM bc_1 KOMPLEX AUS HEFE:

Der Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe wurde nach der Methode von Ljungdahl et al (1986) präpariert. Für eine Präparation benötigt man ungefähr 3 g mitochondriales Protein, das am einfachsten aus gekaufter Hefe mit der Dynamillmethode isoliert werden konnte. In Abb. 3 ist das Proteinmuster mit einer Hämfärbung, das man in einem SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger et al (1985) erhält, abgebildet. In Abb. 6 ist ein Redoxdifferenzspektrum des Cytochrom bc_1 Komplexes aus Hefe wiedergegeben.

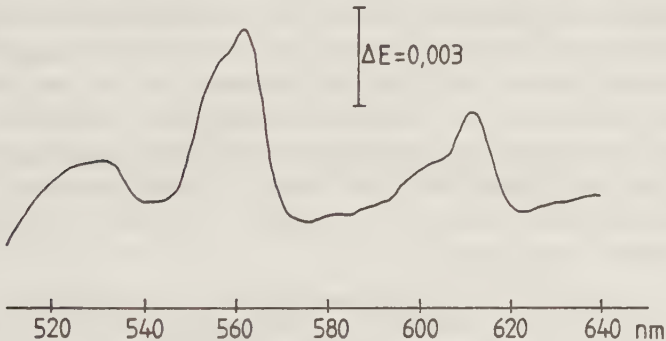


Abb. 6: Redoxdifferenzspektrum vom Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe. Probe mit Dithionit reduziert gegen Probe mit Ferricyanid oxidiert gemessen.

Die Enzymaktivität des Komplexes wurde als Reduktion von Cytochrom c (aus Pferdeherz) mit Ubichinol 2 als Elektronen-donor gemessen und betrug 465 μ Mole Cyt c pro nMol Cyt b-Häm x und Stunde.

3.1.5. SPINATTHYLAKOIDE:

Thylakoide wurden aus Spinat nach der Methode von Nelson et al (1970) hergestellt. Im Ferredoxin abhängigen Elektronentransport gehen die Elektronen von Photosystem I über Ferredoxin zum Cytochrom b_6f Komplex und von dort über Plastocyanin zum Photosystem I zurück. Im Gegensatz zum Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport ist der PMS zyklische Elektronentransport nicht durch Antimycin und durch Hemmstoffe des Cytochrom b_6f Komplexes hemmbar, da die Elektronen nicht über diesen Komplex transportiert werden, sondern direkt von Photosystem I über PMS an Plastocyanin weitergegeben werden (Trebst & Hauska 1974). Entkoppler verhindern in beiden Systemen die ATP Synthese. Um zu überprüfen, ob ein Hemmstoff entkoppelnde Eigenschaften hat oder spezifisch den Elektronentransport im Ferredoxin abhängigen Elektronentransport hemmt, wurde sein Einfluß auf die ATP Synthese auch im PMS zyklischen System untersucht. Im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport wurden während der dreiminütigen Belichtungszeit 400 nMole ATP/100µg Chlorophyll, im PMS zyklischen System während der gleichen Belichtungsdauer 800 nMole ATP/100µg Chlorophyll gebildet.

3.1.6. CYTOCHROM b_6f KOMPLEX AUS SPINAT:

Der Cytochrom b_6f Komplex wurde nach der Methode von Hurt & Hauska (1981) präpariert. Ein Redoxdifferenzspektrum ist in Abb. 7 dargestellt. Bei 554 nm erkennt man die Bande von Cytochrom f, bei 561 nm die von Cytochrom b_6 . Die Proteine wurden in einer Polyarylamidgelelektrophorese aufgetrennt und die hämtragenden Proteine mit Tetramethylbenzidin/ H_2O_2 angefärbt (Abb. 8). Man erkennt das 17 kD Protein, das Rieske Protein, die Cytochrome b und f und im höher molekularen Bereich eine leichte Verunreinigung. Cytochrom f und Cytochrom b wurden bei der Hämfärbung angefärbt.

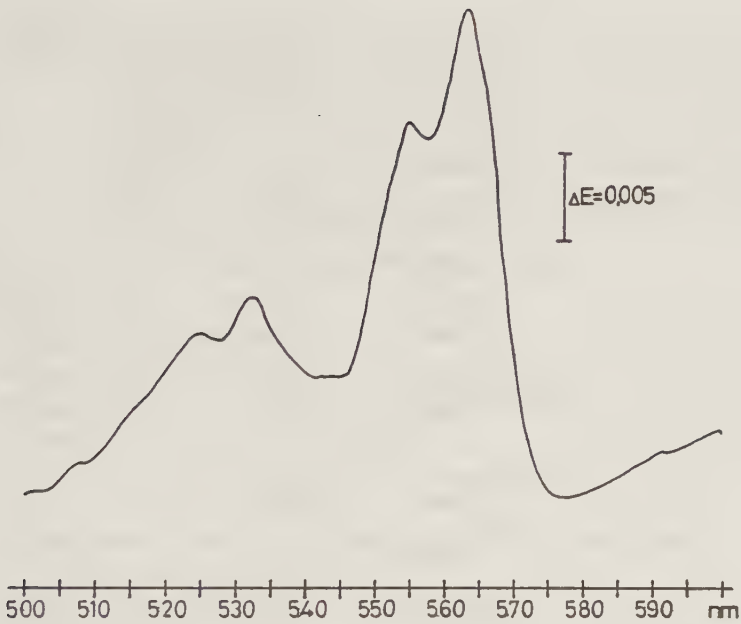


Abb. 7: Redoxdifferenzspektrum vom Cytochrom b_5f Komplex aus Spinat. Probe mit Dithionit reduziert gegen Probe mit Ferricyanid oxidiert gemessen.

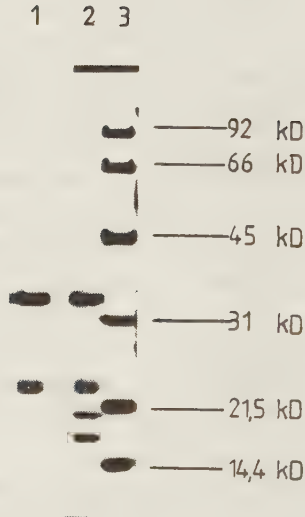


Abb. 8: Proteinmuster im 11-15% SDS-PAGE vom Cytochrom *b₆f* Komplex aus Spinat: 1= Hämefärbung, 2=Coomassiefärbung 3=Markerproteine.

Die Oxidoreduktaseaktivität des Cytochrom *b₆f* Komplex wurde mit 2,5-di-tert-Butylhydrochinon als Elektronendonator und mit Cytochrom *c* (aus Pferdeherz) als Elektronenakzeptor an einem Zweistrahlphotometer gemessen und betrug in Abwesenheit von Plastocyanin 1.3 μ Mole Cytochrom *c* pro nmol Cytochrom *f* und Stunde. Bei Zugabe von 0.4 μ M Plastocyanin erhöhte sich die Aktivität auf 5.5 μ Mole Cytochrom *c* pro nMol Cytochrom *f* und Stunde und entspricht damit der von Hurt & Hauska (1981) angegebenen Aktivität. Die starke Zunahme der Aktivität durch Zugabe des natürlichen Akzeptors Plastocyanin deutet auf eine hohe Integrität des Komplexes hin. Der Cytochrom *b₆f* Komplex

war durch 10 μ M Antimycin nicht hemmbar.

Tabelle 2: Vergleich der Cytochrom bc Komplexe aus Hefe, Rind und Spinat. Die Oxidoreduktaseaktivitäten sind in μ Mole Cytochrom c reduziert pro nMol Cytochrom b-Häm und Stunde angegeben und wurden bei dem Wellenlängenpaar 550-540 nm bestimmt. Als Elektronendonator diente bei den Komplexen aus Rind und Hefe Ubichinol 2, bei dem aus Spinat 2,5 di-tert-Butylhydrochinon. Für Antimycin und Stigmatellin sind die Konzentrationen angegeben, bei der 50 % der Oxidoreduktaseaktivität gehemmt wurden.

	Cyt bc ₁ Rind	Cyt bc ₁ Hefe	Cyt b ₆ f Spinat
Aktivität	755	465	3.4
Antimycin	16 nM	6 nM	keine
Stigmatellin	70 nM	50 nM	70 nM
Unterein-	11	10	4
heiten			

3.2. HEMMSTOFFEIGENSCHAFTEN DER ANTIMYCINDERIVATE:

Sowohl bei Bindungsexperimenten als auch bei Photoaffinitätsmarkierungen muß der Hemmstoff in sehr geringen Konzentrationen nachweisbar sein. Dies wird in der Regel durch radioaktive Markierung des Hemmstoffs erreicht. Antimycin kann aufgrund seiner komplizierten chemischen Struktur nicht auf einfache Weise chemisch synthetisiert werden, eine Wilsbach-Tritierung des käuflichen aus Streptomyces kitazawensis isolierten Antimycins könnte zu einer Veränderung des Moleküls führen. Wenn nur ein Teil des Antimycinmoleküls für dessen Hemmwirkung notwendig ist, könnte dieses vereinfachte Struktur radioaktiv synthetisiert werden und als Antimycinanalogon für Bindungsstudien und nach Einführung einer Azidogruppe für Photoaffinitätsmarkierungen verwendet werden. Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit der Frage beschäftigt, welche Strukturelemente des Antimycins für seine Hemmwirkung verantwortlich sind. Dickie et al (1963) z.B. ersetzten den Dilaktonring des Antimycins durch eine langkettige Alkylgruppe; die hemmenden Eigenschaften des Antimycins blieben erhalten. Neft & Farley (1971) zeigten, daß 5-Nitro-, 5-formamido- und

3,5-Dinitrosalicyl N-(n-octadecyl)amide antimycinähnliche Eigenschaften haben.

Wilson et al (1985) synthetisierten Tritium markiertes 3-Azidosalicyl-N-(n-octadecyl)amid (AZODA) und zeigten daß AZODA bei Photoaffinitätsmarkierungen in Chromatophoren und im Cytochrom bc₁ Komplex von *Rhodobacter sphaeroides* ein 11kD Protein markiert und die Succinat Cytochrom c Reduktase in Chromatophoren hemmt.

Patel et al (1986) zeigten, daß Dichlorsalicylamidderivate den Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport hemmen. Die Salicylamidderivate können bei der Verwendung eines markierten Amins radioaktiv synthetisiert werden.

Die in Abb. 9 dargestellten Antimycinanaloge wurden von der Arbeitsgruppe Dr.W. Oettmeier synthetisiert und in der vorliegenden Arbeit auf ihre Hemmstoffeigenschaften in Rinderherzmitochondrien, Hefemitochondrien und in Spinatthylakoiden untersucht. Die DCMU resistente Hefemutante Diu 2-766 weist keine veränderte Antimycinempfindlichkeit auf. Eine unterschiedlich starke Hemmung der beiden Hefestämme durch ein Antimycinderivat würde auf eine durch die Mutation bedingte Veränderung der Bindestelle für dieses Derivat schließen lassen, die aber keinen Einfluß auf die Antimycinempfindlichkeit hat. Dies würde einen Vergleich der Bindestelle für die Salicylamidderivate mit der für Antimycin ermöglichen. In Mitochondrien wurde der Sauerstoffverbrauch mit NADH als Elektronendonator gemessen. In Spinatthylakoiden wurde die Hemmung der ATP Synthese im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport gemessen. Um zu überprüfen, ob der Hemmstoff den Elektronentransport im Ferredoxin zyklischen Transport hemmt oder entkoppelnde Eigenschaften hat, wurde zusätzlich seine Wirkung im PMS zyklischen Elektronentransport gemessen. Der Ferredoxin abhängige, zyklische Elektronentransport ist durch Antimycin bei einer Konzentration von 0.14 µM zu 50 % hemmbar. Der PMS zyklische wird dagegen nur bei sehr hohen Konzentrationen, bei denen Antimycin entkoppelnde Eigenschaften hat, gehemmt.

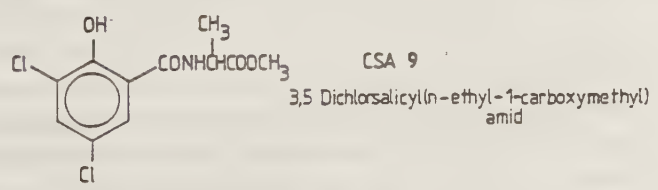
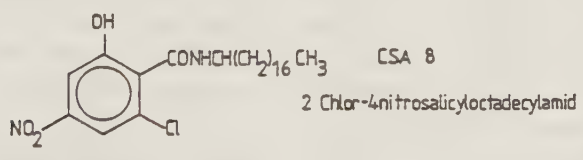
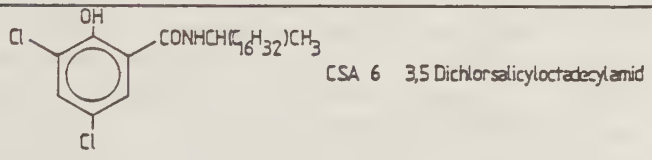
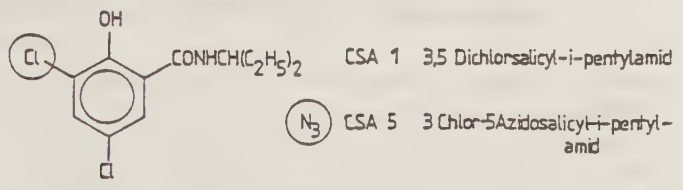
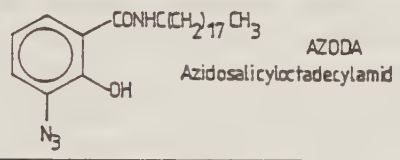
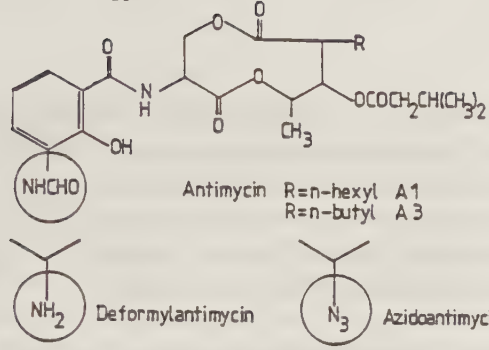


Abb. 9: Strukturformeln der synthetisierten und getesteten Antimycinderivate. Zum Vergleich ist die Formel von Antimycin wiedergegeben.

In Tab. 3 sind die Konzentrationen der Salicylamidderivate, bei der 50 % des Sauerstoffverbrauchs in Mitochondrien bzw. 50 % der ATP Synthese in Spinatthylakoiden gehemmt werden (I_{50} Wert), aufgeführt. Bei den Derivaten, die nur schwach hemmende Eigenschaften haben, ist die prozentuale Hemmung bei einer bestimmten Konzentration angegeben.

Tabelle 3: Hemmstoffeigenschaften von Antimycin und Antimycinderivaten in Rindmitochondrien, Hefemitochondrien des Wildtyps W+ und der Diuron resistenten Mutante Diu 2-766 und in Spinatthylakoiden. Die molaren Konzentrationsangaben geben den I_{50} Wert an oder die Konzentration, bei der x % Hemmung erzielt wurde. Die Hemmstoffe sind in Abb. 9 dargestellt. Die μg Angaben stehen für die in 2 ml eingesetzten μg Mitochondrienprotein bzw. μg Chlorophyll und sind in () wiedergeben.

Hemmstoff	Rind	Hefe W+	Hefe Diu	Ferredox.	PMS
Antimycin	61 nM (450)	4.3 nM (105)	6.2 nM (105)	0.14 μM (100)	10 μM 29% (100)
CSA 1	50 μM (500)	16 μM (160)	26 μM (160)	2 μM (100)	60 μM (100)
CSA 5	10 μM 0% (750)	100 μM 43% (160)	100 μM 38% (160)	10 μM 74% (100)	10 μM 52% (100)
CSA 6	38 μM (450)	100 μM 45% (105)	100 μM 10% (105)	10 μM 71% (100)	10 μM 12% (100)
CSA 8	2 μM (300)	7.5 μM (160)	10 μM (160)	?	10 μM 87% (100)
CSA 9	100 μM 0% (300)	100 μM 33% (160)	100 μM 37% (160)	n.b.	n.b.
AZODA	10 μM 0% (450)	10 μM 0% (160)	10 μM 0% (160)	100 μM 26 % (100)	100 μM 33% (100)

Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß in Rinderherzmitochondrien alle Salicylsäurederivate deutlich geringere Hemmeigenschaften als Antimycin haben. 2-Chlor-4-nitrosalicylsäureoctadecylamid (CSA 8) stellt mit einem I_{50} von 2 μM den besten Hemmstoff in Rinderherzmitochondrien dar.

Mit einem I_{50} von $7.5 \mu\text{M}$ im Wildtyp und einem von $10 \mu\text{M}$ in der DCMU resistenten Mutante ist 2-Chlor-4-nitrosalicylsäureoctadecylamid (CSA 8) auch in Hefemitochondrien der beste Hemmstoff der hier getesteten Gruppe der Salicylsäureamidderivate und ist dennoch 1600 mal schlechter als Antimycin. Der etwas geringere I_{50} Wert für Antimycin in den Mitochondrien des Wildtyps im Vergleich zur Mutante findet sich bei den Salicylsäureamidderivaten wieder, dieser Unterschied ist jedoch so klein, daß daraus keine Schlußfolgerungen gezogen werden können.

In Spinatthylakoiden zeigen alle Salicylamidderivate schwach entkoppelnde Eigenschaften im PMS zyklischen Elektronentransport. AZODA (Azidosalicylsäureoctadecylamid) hemmt die ATP Synthese im PMS zyklischen Elektronentransport kaum, hat aber auch keine hemmende Wirkung im Ferredoxin abhängigen Elektronentransport.

3,5-Dichlorsalicyl-i-pentylamid (CSA 1) hemmt die ATP Synthese im Ferredoxin abhängigen Elektronentransport bei $2 \mu\text{M}$ zu 50 %, dies bestätigt ungefähr die Resultate von Patel et al (1986). Die ATP Synthese im PMS zyklischen System wird jedoch bei $60 \mu\text{M}$ zu 50 % gehemmt. Ein Teil der Hemmung der ATP Synthese im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport ist also auf Entkopplung zurückzuführen.

Im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport dient Ferredoxin als Mediator. Es wird durch Vorbelichtung in Abwesenheit von DCMU im linearen Elektronentransport reduziert. Nach der Vorbelichtung wird Photosystem II durch DCMU gehemmt. Die Konzentration von DCMU muß dabei so gewählt werden, daß durch 'leakage' verloren gegangene Elektronen über Photosystem II wieder zugeführt werden können und somit wieder das richtige Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Ferredoxin vorliegt. Dieses Redoxpoising durch Photosystem II, könnte durch einen Hemmstoff beeinflußt werden, der Photosystem II hemmt und auf diesem Wege zu einer verringerten ATP Synthese im ferredoxinabhängigen Elektronentransport führt. Um diesen Effekt auszuschließen, wurden Kontrollversuche mit dem von Hartung (1985) beschriebenen H_2 /Hydrogenase System aus Chlostridium pasterianum durchgeführt. Dabei übernimmt die Hydrogenase mit H_2 das Redoxpoising, Photosystem II kann

vollständig durch DCMU gehemmt werden. Die Hydrogenase/ H_2 gepoisten Versuche ergaben diesselben Resultate wie die durch Photosytem II / DCMU gepoisten.

Die Antimycinempfindlichkeit der Mitochondrien bzw. der Thylakoide und die Gramicidin Empfindlichkeit des PMS zyklischen Elektronentransport wurde in allen Versuchen parallel zu den Antimycinanaloga überprüft.

Zusammenfassend folgt aus diesen Ergebnissen, daß die hier getesteten Salicylamidderivate nicht als Antimycinanaloga in Frage kommen, wenn man den respiratorischen Elektronentransport in Rind und Hefe und den Ferredoxin abhängigen Elektronentransport in Spinat betrachtet.

Aus Antimycin (Sigma) synthetisierte die Arbeitsgruppe Dr.W. Oettmeier, Bochum freundlicherweise Deformamidoazidoantimycin. Deformamidoazidoantimycin wurde 1973 erstmals von das Gupta & Rieske als Antimycinanalogon für Photoaffinitätsmarkierungen synthetisiert. Da Deformamidoazidoantimycin äußerst lichtempfindlich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit seine hemmenden Eigenschaften in Rindmitochondrien im Dunkeln getestet. Bei 90 nM wurden 50% des respiratorischen Elektronentransports, bei 300 µg mitochondrialem Protein in 2 ml Reaktionsmedium, gehemmt.

Ob Deformamidoazidoantimycin auch den Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport hemmt, konnte aufgrund seiner hohen Lichtempfindlichkeit nicht überprüft werden. Antimycin und Deformamidoazidoantimycin, das wegen der photolabilen Azidogruppe für Photoaffinitätsmarkierungen verwendet werden könnte, sind die wirksamsten Hemmstoffe der getesteten Antimycinderivate.

3.3. SYNTHESE VON RADIOAKTIVEM ANTIMYCIN IN VIVO

Da die Salicylamidderivate sich nicht als Antimycinanaloga im respiratorischen Elektronentransport von Rind und Hefe und im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport erwiesen haben, ergab sich die Notwendigkeit, Antimycin in Streptomyces in vivo radioaktiv zu synthetisieren. Von Dr. Dorgerloh (Bayer

AG) erhielten wir freundlicherweise die Streptomycesstämme mit den Anzuchtbedingungen. Zunächst mußten Methoden zur Isolierung und zur Quantifizierung von Antimycin etabliert werden, um den Verlauf und die Menge der Antimycinproduktion in den unterschiedlichen Medien zu erfassen.

3.3.1. ISOLIERUNG VON ANTIMYCIN AUS STREPTOMYCES:

Antimycin wurde aus den Streptomycetenkulturen mit Chloroform extrahiert, die Chloroformphase wurde eingeeengt, auf eine Kieselgelplatte aufgetragen und in Chloroform/Methanol 9/1 chromatographiert. Der rf-Wert von käuflichem Antimycin beträgt 0.71, der von dem aus Streptomyces isolierten 0.66.

Das Wachstum einer Bakterienkultur kann entweder durch Zählen der Zellzahl oder durch Bestimmung der optischen Dichte oder durch Bestimmung des durch das Wachstum steigenden Proteingehalts ermittelt werden. Streptomyces bilden pilzhyphenähnliche Gebilde und klumpen zu stecknadelgroßen Haufen zusammen; ein Zählen der Zellzahl war daher unmöglich. Die Medien 43 und 63 sind sehr trübe, die Zellzahl konnte weder mit spektrophotometrischer Methode noch mit Hilfe graduierter Röhrchen abgeschätzt werden. Der Proteingehalt der Medien ist so hoch, daß die Zunahme des Proteins durch Zellwachstum durch die Abnahme des Proteins im Medium ausgeglichen wird. Medium 43 ist nicht trübe, dort konnte das Wachstum nach einer Ultraschallbehandlung der Kulturbrühe, durch die die Stecknadel großen Zellklumpen solubilisiert wurden, photometrisch verfolgt werden. In den folgenden Versuchen wird, um einen Vergleich der Ergebnisse mit den verschiedenen Medien zu ermöglichen, die Wachstumsdauer angegeben.

3.3.2. QUANTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ANTIMYCIN

In der Literatur sind zwei Methoden zur Quantifizierung von Antimycin bekannt, nämlich die fluorimetrische und die spektroskopische.

3.3.2.1. Fluorimetrische Bestimmung von Antimycin:

Die Fluoreszenz von Antimycin wird bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm gemessen. Eichkurven im nM und μ M Bereich, die mit Antimycin von Sigma oder Boehringer in Methanol gemacht wurden, sind in Abb. 10 dargestellt. Bei der Bestimmung von Antimycin, das aus *Streptomyces* isoliert worden war, wurde in dem jeweiligen Messbereich am selben Tag eine Eichkurve erstellt.

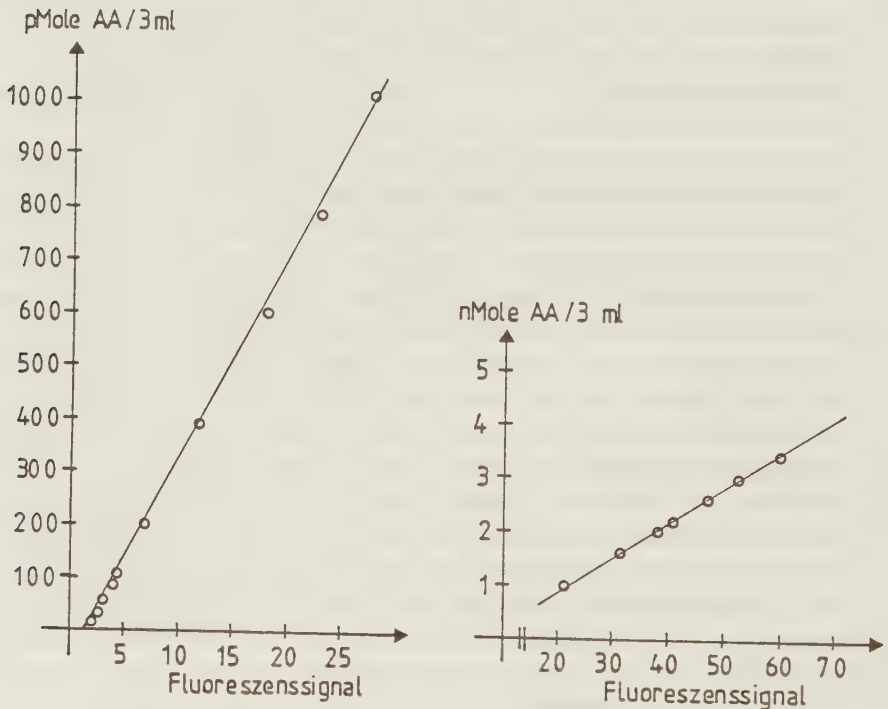


Abb. 10: Eichkurven der fluorimetrischen Bestimmung von Antimycin. Anregungswellenlänge: 355nm, Emissionswellenlänge: 420 nm. Fluoreszenzsignal bei 100 facher Verstärkung.

Die fluorimetrische Methode ist besonders für die Bestimmung von radioaktivem Antimycin geeignet, da nur sehr geringe Mengen

benötigt werden und nur die Küvetten kontaminiert werden. Um den Verlauf der Antimycinproduktion zu beobachten, ist es wünschenswert, Antimycin in Kulturbrühextrakten ohne aufwendige Reinigung zu bestimmen. Die Kulturbrühen wurden dafür mit Methanol extrahiert und von unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Eine Antimycinbestimmung in den Überständen war leider mit der fluorimetrischen Methode nicht möglich, da Medium 63 und Medium 41 Stoffe enthalten, die bei diesen Wellenlängen fluoreszieren. Medium 43 hat eine sehr geringe Eigenfluoreszenz, die abgezogen werden konnte. In Hinblick auf die Synthese von radioaktivem Antimycin durch Einbau von markierten Vorstufen war es wünschenswert, Medien unterschiedlicher Zusammensetzung zur Verfügung zu haben und die Isolierung von Antimycin aus Streptomyceskulturen nicht nur für Medium 43 zu etablieren.

3.3.2.2. Spektrophotometrische Bestimmung und Charakterisierung von Antimycin:

Hierfür wurde ein Spektrum von 220 - 400 nm von einer methanolischen Antimycinlösung aufgenommen und die Konzentration bei 320 nm mit einem Extinktionskoeffizient von $4.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Die spektrophotometrische Bestimmung ermöglichte nicht nur eine Quantifizierung, sondern auch eine Charakterisierung des Antimycins. Die Spektren von gekauftem und von isoliertem Antimycin sind in Abb. 11a/b dargestellt. Antimycin von Boehringer hatte ein Absorptionsmaximum bei 320 nm, aus Streptomyces isoliertes ein Maximum bei 340 nm. Wenn das gekaufte Antimycin wie der Kulturbrühenextrakt auf eine Kieselgelplatte aufgetragen wurde und nach dem Chromatographielauf eluiert wurde, hatte es ebenfalls ein Maximum bei 340 nm (Abb. 11c). Durch Zugabe von etwas Säure konnte das Maximum wieder auf 320 nm verschoben werden. Zugabe von Säure zu dem selbst isoliertem Antimycin veränderte das Absorptionsmaximum nicht.

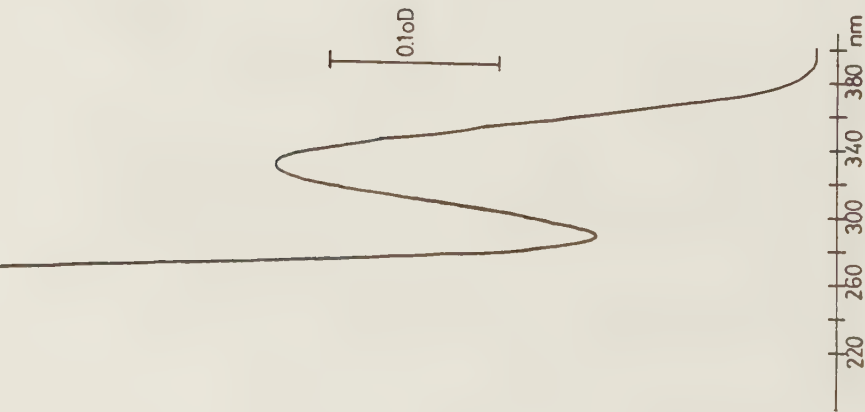


Abb. 11 a) Spektrum von 220-400 nm von einer 40nM Antimycinlösung (Antimycin von Sigma) in Methanol.

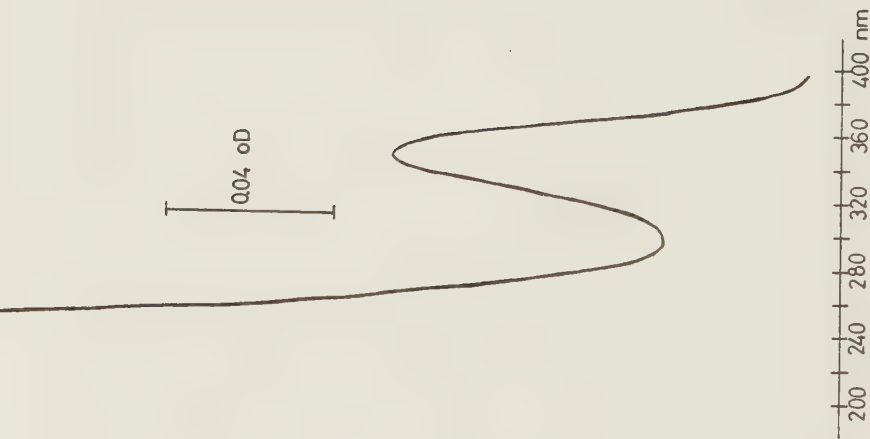


Abb. 11 b) Spektrum von 200-400 nm von Antimycin in Methanol, aus Streptomyces isoliert und über Dünnschichtchromatographie gereinigt.

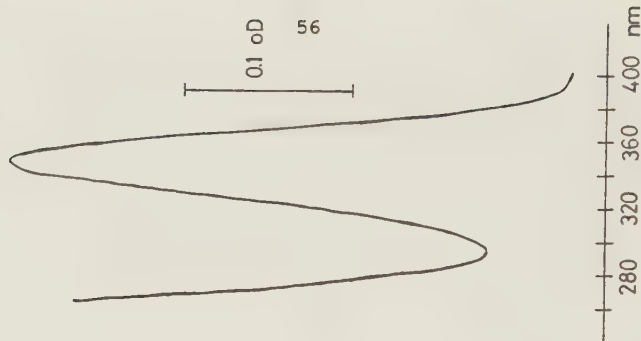


Abb. 11 c) Spektrum von 260-400 nm von Antimycin (Sigma), das nach Dünnschichtchromatographie mit Methanol eluiert wurde.

Eine spektrophotometrische Quantifizierung von Antimycin in Kulturbrühen war ohne Reinigung über eine Kieselgelplatte nicht möglich.

Die Konzentrationsbestimmung einer Lösung mit isoliertem und gereinigtem Antimycin mit spektrophotometrischer und fluorimetrischer Methode führten zum selben Ergebnis. Eine Charakterisierung der Antimycinisomere ist aber mit beiden Methoden nicht möglich.

3.3.2.3. Quantifizierung und Charakterisierung von Antimycin mit HPLC:

Die verschiedenen Isomere von Antimycin konnten durch HPLC auf einer reversed phase Säule getrennt werden. Dadurch war eine Charakterisierung der Antimycinisomere, die aus den auf verschiedenen Medien angezogenen Streptomyceskulturen isoliert wurden und ein Vergleich dieser Antimycinisomere mit dem käuflichen Antimycin möglich. Die Detektion erfolgt bei 230 nm. In Abb. 12 ist ein HPLC Lauf von Antimycin (Boehringer) wiedergegeben.

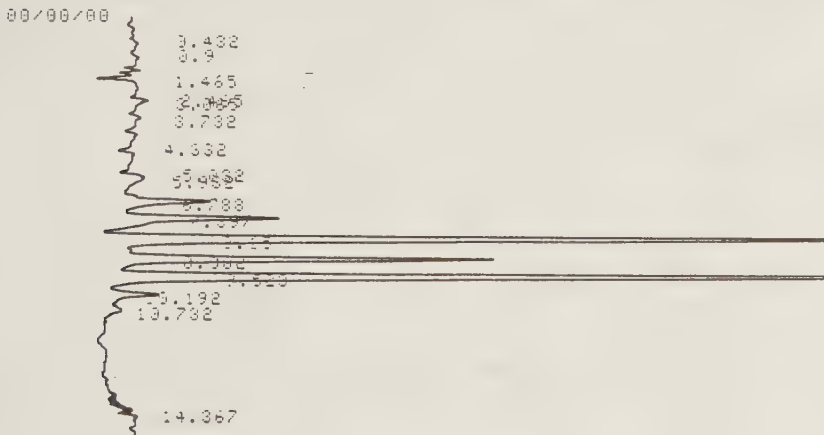


Abb. 12: HPLC Lauf von 2 µg Antimycin (Boehringer) in Methanol, Empfindlichkeit=6, Detektion bei 230 nm. HPLC bedingungen siehe 2.12 c.

Die Antimycinisomere wurden bei dem hier verwendeten Gradientenprogramm mit einer Retentionszeit von 6.7 bis 10.2 Minuten eluiert. Die Zuordnung der einzelnen Peaks zu den verschiedenen Isomeren wurde nicht untersucht. Eine Eichkurve für Antimycin wurde mit HPLC Läufen für den Bereich 0.5 µg-2 µg Antimycin erstellt. Eine reproduzierbare, gute Korrelation zwischen eingesetzten µg Antimycin und Flächeneinheiten ergab sich für eine Retentionszeit von 7.5-10.2 Minuten. Die Eichkurve ist in Abb. 13 dargestellt.

Für die Bestimmung und Charakterisierung von Antimycin in den Streptomycetenkulturen wurden die Kulturbrühen mit Methanol extrahiert, von unlöslichen Bestandteilen getrennt und über Kieselgelsäulen gereinigt. Ein HPLC Lauf von einer Streptomycetenkultur auf Medium 41 ist in Abb. 14 wiedergegeben. In der Retentionszeit von 7.5-10.2 Minuten, in der nach der Erstellung der Antimycineichkurve die Antimycinisomere eluieren, sind mehrere Peaks zu sehen. Das Größenverhältnis der Antimycinisomere aus den Kulturen mit Medium 41 unterscheidet sich von dem der Isomere von Antimycin von Boehringer. Die Quantifizierung des Antimycins in den Kulturen mit Medium 41 wurde durch eine fluorometrische Bestimmung bestätigt.

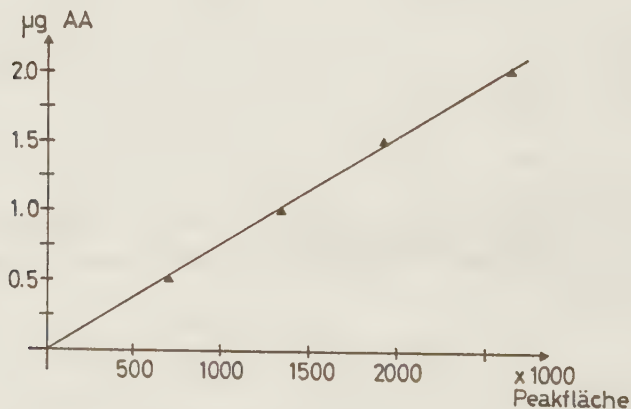


Abb. 13: HPLC-Eichkurve für Antimycin. Auf der x-Achse sind die Flächeneinheiten der Peaks, die innerhalb der Retentionszeit von 7.5-10.2 Minuten eluieren, aufgetragen.

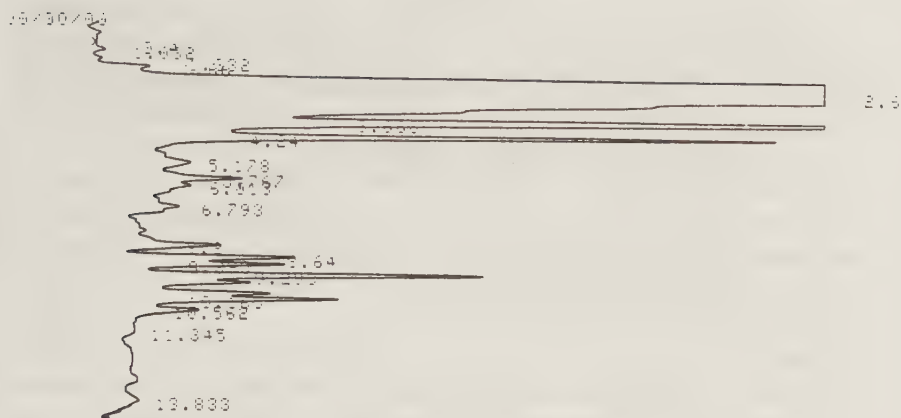


Abb. 14: HPLC-Lauf von Antimycin, das aus Streptomyceskulturen DOM 609, die auf Medium 41 gewachsen waren, isoliert wurde. Empfindlichkeit=6, Detektion bei 230 nm. HPLC Bedingungen siehe 2.12 c.

Ein HPLC Lauf von einer Streptomycetenkultur auf Medium 63 ist in Abb. 15 dargestellt. Es können keine Antimycinisomere nachgewiesen werden. Streptomycetenkulturen auf Medium 43 enthalten Antimycinisomere, deren Verhältnis zueinander weder dem der Kulturen auf Medium 41 noch dem des gekauften Antimycins entsprechen, wie in Abb. 16 zu sehen ist.

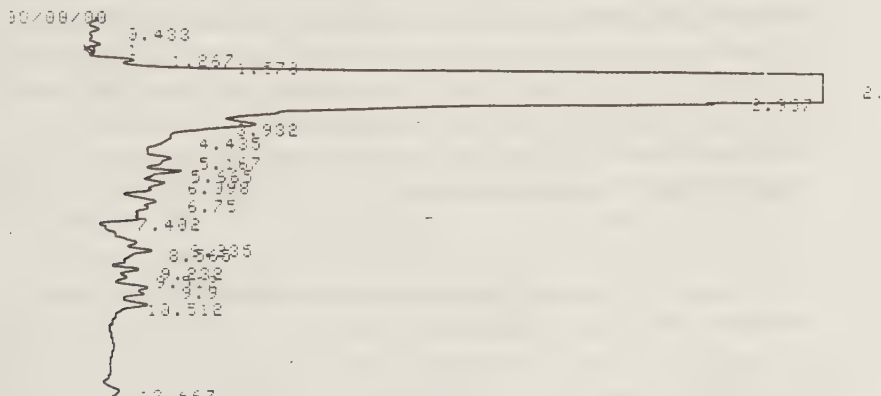


Abb. 15: HPLC-Lauf von Antimycin, das aus einer Streptomycetenkultur DOM 609 isoliert wurde, die auf Medium 63 gewachsen war. Empfindlichkeit=6, Detektion bei 230 nm. HPLC Bedingungen siehe 2.12 c.

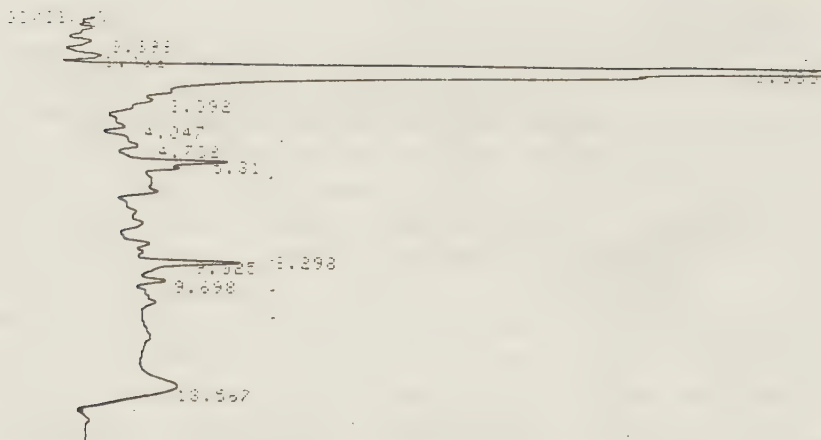


Abb. 16: HPLC-Lauf von Antimycin, das aus einer Streptomyces-kultur DOM 609, die auf Medium 43 gewachsen war, isoliert wurde. Empfindlichkeit=6, Detektion bei 230 nm. HPLC Bedingungen siehe 2.12 c

Zusammenfassend folgt aus den HPLC Analysen, daß in Streptomyceskulturen, die auf Medium 41 oder 43 gezogen wurden, Antimycinisomere nachgewiesen werden können, deren Zusammensetzung sich aber von dem bei Boehringer gekauften Antimycin unterscheidet. Mit der HPLC Methode konnte in Streptomyceskulturen, die auf Medium 63 gewachsen waren, kein Antimycin nachgewiesen werden. Um den Verlauf der Antimycinproduktion in den Kulturen zu verfolgen, ist die HPLC Methode ungeeignet, da sie zu zeitaufwendig ist. Sie ist aber die einzige Methode, mit der die Antimycinisomere getrennt und charakterisiert werden können.

3.3.2.4. Quantifizierung und Charakterisierung von Antimycin mit einem Bioassay:

Quantifizierung:

Wie aus den HPLC Analysen folgt ist die Zusammensetzung der Antimycinisomere im isolierten Antimycins anders als in dem gekauften. Ziel des Bioassay sollte nicht die genaue

Quantifizierung von Antimycin sein, wie sie mit den obengenannten Methoden erfolgte, sondern die Überprüfung der physiologischen Aktivität der Antimycinisomere, die aus den Streptomyceskulturen isoliert wurden. Außerdem sollte mit der Bioassay Methode eine schnelle Abschätzung der Antimycinproduktion möglich sein. Der zeitliche Verlauf der Antimycinproduktion muß bekannt sein, damit bei der radioaktiven Synthese von Antimycin die markierten Substanzen zu Beginn der größten Produktionsrate von Antimycin zugegeben werden können.

Antimycin ist mit einem I_{50} Wert von 60 nM ein sehr effektiver Hemmstoff des respiratorischen Elektronentransports von NADH zu O_2 in Rinderherzmitochondrien. Infolgedessen konnten bei 2 ml Testvolumen 120 pmole Antimycin sehr gut und sehr schnell nachgewiesen werden. Eine Reinigung des Kulturbrühenextraktes war nicht nötig. Die Kulturbrühen wurden lediglich mit Methanol extrahiert und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt. Von dem Überstand wurde die μ l Menge ermittelt, die zu einer Hemmung von 30-80% des O_2 Verbrauchs führt und der Verlauf der benötigten Menge in den verschiedenen Medien beobachtet.

Charakterisierung:

In Rinderherzmitochondrien wurde die Konzentration von isoliertem Antimycin, bei der 50% des O_2 Verbrauchs gehemmt werden, bestimmt. Da der I_{50} Wert von Antimycin von der Menge der in dem Testansatz enthaltenen Mitochondrien abhängt, wird diese im folgenden angegeben. Der I_{50} Wert für käufliches Antimycin ist bei 450 μ g mitochondrialem Protein in 2 ml Testansatz 60 nM. Mit dem isolierten Antimycin wurden bei unterschiedlichen Mengen an mitochondrialem Protein im Testansatz I_{50} Werte bestimmt. Der I_{50} Wert bei 350 μ g mitochondrialem Protein lag bei 26 nM, bei 140 μ g Protein bei 9.4 nM und bei 70 μ g bei 4.2 nM. Aus den Ergebnissen folgt, daß das selbst isolierte Antimycin etwas stärker hemmte als das gekaufte. Dies kann auf die unterschiedliche Zusammensetzung der Antimycinisomere in dem isoliertem im Vergleich zu dem käuflichen Antimycin zurückgeführt werden, wie in den HPLC Analysen

gezeigt wurde. Da der I_{50} Wert des isolierten Antimycin in demselben Bereich lag wie der des käuflichen, erschien es möglich mit dem isolierten Antimycin die Antimycinbindestellen zu charakterisieren.

3.3.3.VERLAUF DER ANTIMYCINPRODUKTION IN DEN STREPTOMYCETENKULTUREN:

Mit Hilfe des Rinderherzmitochondrien Bioassays wurde der Verlauf der Antimycinproduktion in den Streptomycetenkulturen verfolgt. In Medium 63 war in der Zeit von 0-3.5 Tagen kein Antimycin nachweisbar. Dies bestätigt die HPLC Analyse (Abb. 15). In Medium 41 produzieren die Streptomyceten in der Zeit von 0-90 Std. stetig zunehmend Antimycin. In Medium 43 synthetisieren die Streptomyceten in der Zeit von 0-35 Std. sehr viel mehr Antimycin als die Kulturen auf Medium 41. In der Zeit von 45-90 Stunden nimmt die Antimycinproduktion in den Kulturen auf Medium 41 stark zu und erreicht höhere Antimycin-konzentrationen als die Kulturen auf Medium 43. Der zeitliche Verlauf der Antimycinproduktion ist in den Medien 43 und 41 unterschiedlich, in beiden Medien werden große Mengen Antimycin produziert.

Nach 40 Stunden Kultivierung können aus 400 ml Kultur auf Medium 43 1.6 μ Mole Antimycin isoliert werden, nach 64 Stunden 2.3 μ Mole (Bestimmung mit fluorometrischer Methode).

3.3.4.RADIOAKTIVE SYNTHESE VON ANTIMYCIN IN STREPTOMYCETENKULTUREN:

Um Antimycin in den Streptomycetenkulturen radioaktiv zu synthetisieren, soll die Zugabe der radioaktiven Substanz zu Beginn einer hohen Antimycinproduktionsrate erfolgen. Zu diesem Zeitpunkt soll jedoch wenig oder kein Antimycin in der Kultur enthalten sein, da dieses nicht markierte Antimycin die spezifische Aktivität des dann gebildeten Antimycins senken würde. Die Experimente zur Quantifizierung von Antimycin haben

gezeigt, daß Streptomycetenkulturen auf Medium 63 kein nachweisbares Antimycin enthielten. Damit war Medium 63 sehr geeignet für die Vorkultur, da mit ihr die Hauptkultur angeimpft werden konnte, ohne dabei nicht markiertes Antimycin in die Hauptkultur einzubringen. Beim Animpfen der Hauptkultur könnte eine markierte Verbindung zugegeben werden, die während der hohen Antimycinsyntheserate in Antimycin eingebaut werden könnte. Da vorher kein unmarkiertes Antimycin vorlag, könnte so Antimycin mit einer hohen spezifischen Aktivität synthetisiert werden.

3.3.4.1. Einbau von 2-[^{14}C]- $\text{CH}_3\text{COO}^- \text{Na}$ in Antimycin:

Birch et al (1962) untersuchten die Biosynthese von Antimycin in Streptomyces kitazawensis und zeigten, daß [$1\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat in Antimycin eingebaut wird. Zu 50 ml Medium 41 wurden beim Animpfen mit 5 ml Streptomyceskultur (Medium 63, 3.5 Tage gewachsen) 50 μCi [$1\text{-}^{14}\text{C}$] Acetat gegeben und nach 70 Stunden geerntet. Das Antimycin in dieser Kultur war nicht radioaktiv markiert. Der gleiche Versuch wurde mit 25 μCi [$2\text{-}^{14}\text{C}$]-Acetat gemacht. Dabei wurden in Abständen von wenigen Stunden Proben entnommen, ein Aliquot davon wurde zentrifugiert und der Überstand gezählt. Die Aufnahme des radioaktiven Acetats konnte so verfolgt werden und ist in Abb. 17 dargestellt. Nach 23.5 Stunden hatten die Zellen schon 80 % des radioaktiven Acetats aufgenommen. Aus den Proben, die 23, 26, 34, 46 und 51 Stunden gewachsen waren, wurde Antimycin isoliert und die spezifische Aktivität bestimmt. Die spezifische Aktivität betrug zwischen 0.02 nCi/nMol und 0.04 nCi/nMol. Für Bindungsversuche sind aber spezifische Aktivitäten von mindestens 25 nCi/nMol notwendig. Das Verhältnis von Soll- zu Istwert betrug demnach 650.

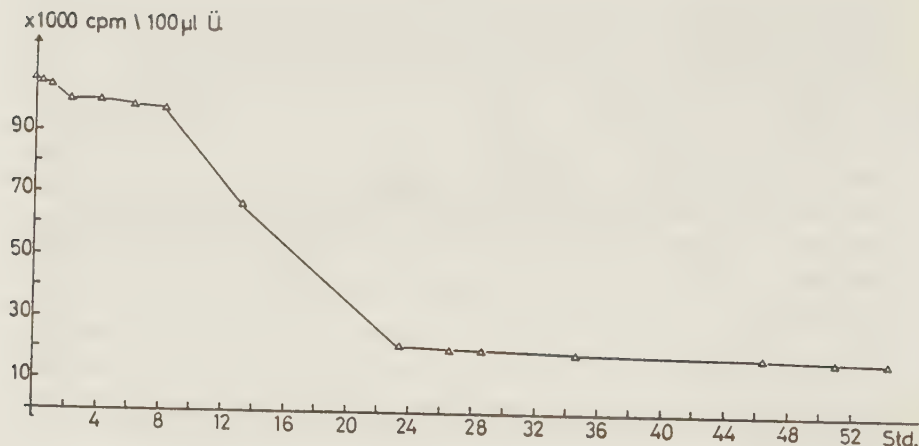


Abb. 17: Abnahme von $[2-^{14}\text{C}]$ -Natriumacetat in Medium 41 infolge der Aufnahme durch *Streptomyces* DOM 609 in Abhängigkeit von der Wachstumszeit. Ü=Überstand der abzentrifugierten Kultur.

Wenn man radioaktives Acetat nicht als zusätzliche Kohlenstoffquelle anbietet, sondern einen Teil der Kohlenstoffquelle in den Medien 41 und 43 durch radioaktiv markiertes Acetat ersetzt, müßte ein stärkerer Einbau des Acetats in den Kohlenstoffkreislauf erfolgen. In Vorversuchen wurde zunächst untersucht, ob die *Streptomyces* auf acetathaltigem Medien wachsen und Antimycin produzieren. Das 'normale' Medium 43 besteht aus:

- 40 g Mannit
- 5 g L-Argininhydrochlorid
- 2 g Magnesiumsulfat x 7 H₂O
- 0.5g Kaliumdihydrogenphosphat
- 1 g NaCl
- 0.5g Bactohefeextrakt
- 0.2 Vol% Spurenelementelösung
- (siehe Material und Methoden)

ad 1000 ml H₂O pH 7.0

In Medium 43/1 wurden 40 g Mannit durch 5 g Mannit und 90 g Acetat ersetzt, der pH wurde auf 7.0 eingestellt. Medium 43/2 enthielt 20 g Mannit und 40 g Acetat, der pH wurde ebenfalls auf 7.0 eingestellt. In der Zeit von 0-3.5 Tage wurden Proben

der Kulturen 43, 43/1 und 43/2 entnommen und mit dem Rinderherzbioassay auf Antimycin untersucht. In Medium 43 zeigte sich der normale Verlauf der Antimycinsynthese, in den Medium 43/1 und 43/2 wuchsen die Streptomyces schlechter und es konnte kein Antimycin nachgewiesen werden.

Ähnliche Versuche wurden mit Kulturen auf Medium 41 durchgeführt. 'Normales' Medium 41 hat folgende Zusammensetzung:

30 g Sojamehl(entfettet)
30 g Glycerin
2 g CaCO_3

Ad 1000 ml H_2O , pH 7.3

In veränderten Medien wurde Glycerin teilweise oder ganz durch Acetat ersetzt. In der Kultur mit Acetat anstelle von Glycerin war kein Antimycin nachweisbar. In den Kulturen, in denen Glycerin nur teilweise durch Acetat ersetzt worden war, wurde um so weniger Antimycin gebildet, je mehr Acetat im Medium war. Auch in Medium 41 führte ein Ersetzen der Kohlenstoffquelle durch Acetat zu einem geringeren Antimycingehalt der Kulturbrühen. Es war also nicht möglich, die Aufnahme des radioaktiven Acetats zu erhöhen, indem man den Zellen Acetat anstelle von Mannit oder Glycerin als Kohlenstoffquelle anbietet.

Die Medien 41 und 43 wurden für die folgenden Einbauversuche unverändert eingesetzt.

3.3.4.2. Einbauversuch mit radioaktivem Mannit, Glycerin, Leucin und Phenylalanin:

Da radioaktives Acetat nur sehr schwach in Antimycin eingebaut wurde und Acetat das Wachstum und die Antimycinproduktion von Streptomyceskulturen beeinflusst, wurden Einbauversuche mit markiertem Glycerin und Mannit durchgeführt, welche die Kohlenstoffquelle in den Medien 41 und 43 darstellen. Neft & Farley (1972) zeigten, daß $\text{L-}[^{14}\text{C}]$ -Phenylalanin in Antimycin von Streptomyces AY-B-265 eingebaut wird. Neben Einbauversuchen mit radioaktivem Phenylalanin wurden solche mit markiertem Leucin durchgeführt, da Birch et al (1962) vorgeschlagen haben,

daß die sich am Dilaktonring befindende veresterte Seitenkette aus Aminosäuren wie Leucin, Valin und Isoleucin synthetisiert wird. Zu je 50 ml Medium 41 wurden beim Animpfen 25 μCi L-[U- ^{14}C]Leucin (342 mCi/mMol) oder 25 μCi D-[1- ^{14}C]Mannit (56 mCi/mMol) oder 25 μCi L-[U- ^{14}C]Phenylalanin (513 mCi/mMol) zugegeben. 25 μCi [U- ^{14}C]-Glycerin (171 mCi/mMol) wurden zu 50 ml angeimpftem Medium 43 hinzugefügt. Im Abstand von wenigen Stunden wurden Proben entnommen und die Aufnahme der radioaktiven Substanzen verfolgt. Das Ergebnis ist in Abb. 18 dargestellt. Glycerin wird am schnellsten aufgenommen. In der Kultur mit radioaktivem Mannit nimmt die Radioaktivität im Überstand nach 26 Stunden wieder zu, das heißt es wird eine markierte Substanz von den Zellen ausgeschieden. Stichprobenartig wurde aus manchen Proben Antimycin isoliert und dessen spezifische Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt.

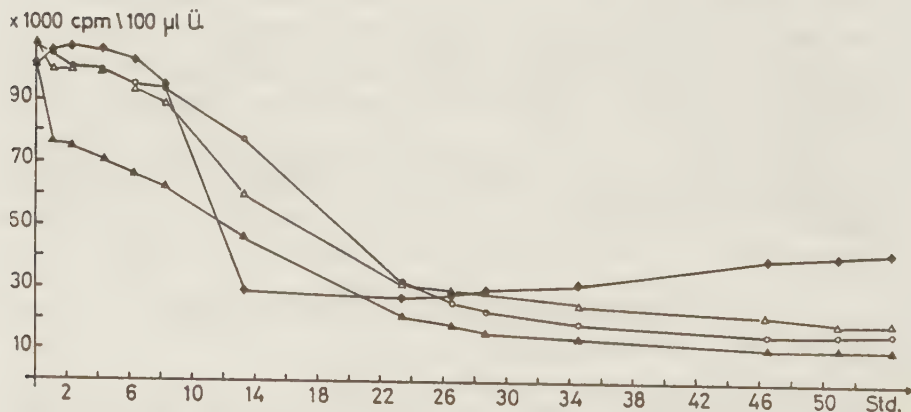


Abb. 18: Abnahme von L-[u- ^{14}C]-Leucin (Δ), von D-[1- ^{14}C]-Mannit ($\blacklozenge$), von L-[U- ^{14}C]-Phenylalanin ($\circ$) in Medium 41 und von [U- ^{14}C]-Glycerin ($\blacktriangle$) in Medium 43 infolge der Aufnahme durch *Streptomyces* DOM'609 in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer. Ü=Überstand der abzentrifugierten Kultur.

Die Kultur, die auf markiertem Glycerin gewachsen war, enthielt nach 29 Stunden Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von

0.072 nCi/nMol, nach 56 Stunden betrug die spezifische Aktivität nur 0.05 nCi/nMol. Die Kultur, die markiertes Leucin enthielt, produzierte in dem Zeitraum von 13-51 Stunden Antimycin mit einer konstanten, spezifischen Aktivität von ungefähr 0.03 nCi/nMol. Die Zugabe von markiertem Mannit führte zur Synthese von Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von 0.017-0.039 nCi/nMol. Selbst mit Phenylalanin, das mit 513 mCi/mMol die höchste spezifische Aktivität von den verwendeten ^{14}C -markierten Verbindungen hatte, war die spezifische Aktivität von Antimycin nur 0.011 nCi/nMol. Der Verlauf der Zu- bzw. Abnahme der spezifischen Aktivität von Antimycin war von der verwendeten, radioaktiven Verbindung abhängig.

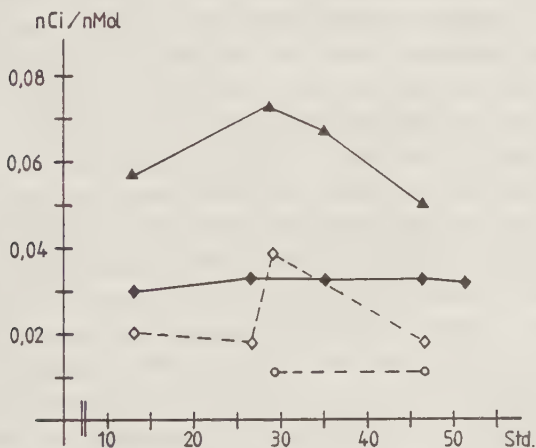


Abb. 19: Spezifische Aktivitäten von Antimycin aus Kulturen, die [^{14}C]-Glycerin (▲), [^{14}C]-Phenylalanin (○), [^{14}C]-Leucin (◆) oder [^{14}C]-Mannit (◇) enthielten, in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer.

Zusammenfassend folgt daraus, daß mit ^{14}C -markiertem Leucin, Phenylalanin, Glycerin, Mannit und Acetat unter diesen Bedingungen kein Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 25 nCi/nMol synthetisiert werden konnte.

3.3.4.3. Einbau von [^3H]-Tryptophan und [^3H]-Methionin in Antimycin:

^{14}C -markiertes Antimycin hätte den Vorteil, daß ein daraus synthetisierter Photoaffinitätslabel eine sehr viel größere Reichweite hätte als ein ^3H -markierter. Infolgedessen würden die photoaffinitätsmarkierten Proben auf den Gelen in kürzerer Zeit einen Röntgenfilm schwärzen. Die Einbauversuche mit den ^{14}C -markierten Verbindungen führten jedoch nicht zu Antimycin mit einer hohen spezifischen Aktivität. Die spezifischen Aktivitäten der in Frage kommenden, erhältlichen Substanzen sind bei den ^{14}C -markierten Substanzen um den Faktor 10 - 100 kleiner als bei den ^3H -markierten. Eine höhere spezifische Aktivität im Ausgangsmaterial müßte bei gleich starkem Einbau auch zu einer höheren spezifischen Aktivität von Antimycin führen. In den folgenden Versuchen wurden deshalb Tritium markierte Substanzen eingesetzt. Neft & Farley (1972) stellten einen Einbau von im Benzolring markiertem [^{14}C]-DL-Tryptophan in den 3-Aminosalicylsäurerest des Antimycins fest. Sie untersuchten auch den Einbau von Tryptophan, das [$2\text{-}^{14}\text{C}$] markiert war und zeigten, daß vor allem die Formamidogruppe des Antimycins markiert wurde. Bei der Synthese von Deformamido-azidoantimycin wird aber gerade diese Formamidogruppe durch eine Azidogruppe ersetzt; eine Markierung in dieser Formamidogruppe würde also bei der Synthese des Photoaffinitätslabel entfernt werden. Für die Synthese von radioaktivem Antimycin, das später eventuell für die Synthese eines Photoaffinitätslabel benutzt werden soll, muß deswegen Tryptophan vor allem im Benzolring markiert sein.

Zu 50 ml Medium 41 wurden beim Animpfen 100 μCi [$\text{L-G-}^3\text{H}$]-Tryptophan (4.7 Ci/mMol) gegeben. Tryptophan war zu 84 % an 4.5.6.7 (Benzolring), zu 7 % an 2 und zu 9 % an der Seitenkette markiert (nach Angaben des Herstellers). Parallel dazu wurden zu 50 ml Medium 41 beim Animpfen 100 μCi [^3H]-Methionin (27 Ci/mMol) gegeben. [^3H]-Methionin könnte als Methylgruppen-donor fungieren. Im Abstand von wenigen Stunden wurden Proben entnommen und die Aufnahme der radioaktiven Substanzen verfolgt. Nach 35stündigem Wachstum waren bei der Kultur mit

[^3H]-Tryptophan nur noch 63 % der Anfangsaktivität im Überstand, bei der Kultur mit [^3H]-Methionin noch 84 % der Aktivität im Überstand. Zu der Kultur mit [^3H]-Tryptophan wurden nochmals 100 μCi [L-G- ^3H]-Tryptophan zugegeben. Zeitabhängig wurden Proben entnommen und aus den Kulturbrühen Antimycin isoliert und dessen spezifische Aktivität bestimmt.

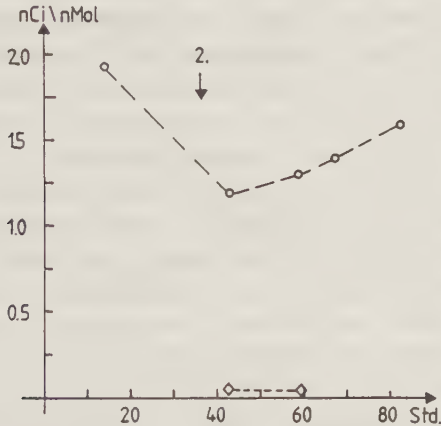


Abb. 20: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivität von Antimycin, das aus Streptomyceskulturen auf Medium 41, die [^3H]-Tryptophan (O) oder [^3H]-Methionin (◇) enthielten, isoliert wurde. Der Pfeil markiert die 2. Zugabe von 100 μCi [^3H]-Tryptophen.

Die Ergebnisse in Abb. 20 zeigen, daß [^3H]-Methionin in Medium 41 zu einer Synthese von Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von 0.044 nCi/nMol führt. Mit [L-G- ^3H]-Tryptophan in Medium 41 konnte nach 14 Stunden Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von 1.85 nCi/nMol isoliert werden. Nach 42 Stunden war die spezifische Aktivität auf 1.2 nCi/nMol gesunken. Die 2. Zugabe von 100 μCi Tryptophan nach 36 Stunden bewirkte einen Anstieg der spezifischen Aktivität von Antimycin auf 1.6 nCi/nMol nach 82 Stunden Wachstum. Mit [L-G- ^3H]-Tryptophan wird unter diesen Bedingungen Antimycin mit einer spezifischen Aktivität synthetisiert, die 25 mal größer ist als die bei den Einbauversuchen mit [^{14}C]-Glycerin erhaltene. Für Bindungsversuche sind jedoch mindestens 25 nCi/nMol nötig, da

infolge der sehr großen Affinität der Antimycinbindestelle die Anzahl der ungebundenen Moleküle bei niedrigen Konzentrationen sehr klein zu erwarten ist. Ist die spezifische Aktivität nicht groß genug, können die wenigen, ungebundenen Moleküle nicht mehr genau gezählt werden. In einem weiteren Versuch wurden je 400 μCi [L-G- ^3H]-Tryptophan zu 25 ml Medium 41 und zu 25 ml Medium 43 gegeben und der Einbau in Antimycin untersucht. Der Gehalt des unmarkierten Tryptophans ist in den beiden Medien höchstwahrscheinlich unterschiedlich und somit auch die im Medium vorliegende spezifische Aktivität von Tryptophan. Außerdem ist der Verlauf der Antimycinsynthese in beiden Medien unterschiedlich. Tatsächlich wird Antimycin in Medium 43 bei Zugabe von markiertem Tryptophan mit einer spezifischen Aktivität von 99 nCi/nMol synthetisiert und unter denselben Bedingungen in Medium 41 nur mit 20 nCi/nMol. In Abb. 21 ist der zeitliche Verlauf des Einbaus von markiertem Tryptophan dargestellt. In Medium 43 hatte Antimycin nach 24 Stunden die höchste spezifische Aktivität mit 99 nCi/nMol, zu diesem Zeitpunkt ist aber die Antimycinmenge sehr klein. Nach 31 Stunden betrug die spezifische Aktivität noch 76, nach 50 Stunden nur noch 30 nCi/nMol.

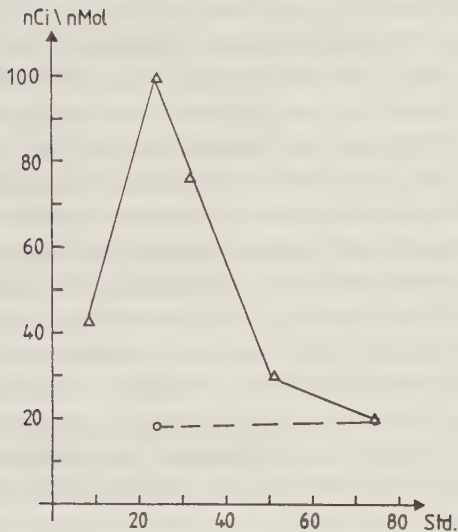


Abb. 21: Zeitlicher Verlauf der spezifischen Aktivitäten von Antimycin, das aus Kulturen auf Medium 41 (o) und auf Medium 43 (Δ), die beide 400 μCi [^3H]-Tryptophan in 25 ml Medium enthielten, isoliert wurde.

3.3.4.4. Präparative Isolierung von radioaktivem Antimycin aus Streptomyces:

Für die präparative Isolierung von radioaktivem Antimycin wurden beim Animpfen mit je 2.5 ml Streptomyceskultur, die 3.5 Tage auf Medium 63 gewachsen war, zu je 25 ml Medium 43 400 μCi [L-G- ^3H]Tryptophan (4.7 Ci/mMol) gegeben. Antimycin wurde nach 39 Stunden aus den Streptomycetenkulturen isoliert. Nach den Vorversuchen mußte zu diesem Zeitpunkt Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von mindestens 55 nCi/nMol vorliegen. Aus 50 ml Kultur konnten 120 nmole Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von 74 nCi/nMol isoliert werden. Um zu überprüfen, ob die Radioaktivität in der aus dem Dünnschichtchromatogramm isolierten Antimycinprobe sich ausschließlich im Antimycin befindet, wurde eine 2. Dünnschichtchromatographie gefahren. Bei der ersten Dünnschichtchromatographie wurde als Laufmittel Chloroform/Methanol 9/1 verwendet. Für die zweite

Chromatographie setzte sich das Laufmittel aus 6 Teilen Chloroform und 4 Teilen Methanol zusammen. Die Wahrscheinlichkeit, daß eine Verunreinigung, die radioaktiv ist, in beiden Laufmitteln mit dem R_f -Wert von Antimycin läuft, ist gering. Die Verteilung der Radioaktivität auf dem 2. Chromatogramm wurde mit einem Radioscanner aufgenommen. In Abb. 22 sieht man, daß nur an einer Stelle des Chromatogramms Radioaktivität nachgewiesen werden konnte, dort befand sich auch das unter der UV Lampe sichtbare Antimycin. Das radioaktive Antimycin wurde portioniert in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Da Antimycin instabil ist, wurden in Abständen von wenigen Wochen Kontrollchromatogramme gefahren, auf denen die Verteilung der Radioaktivität mit einem Radioscanner überprüft wurde. In Abb. 23 ist ein Radioscan von einem Chromatogramm mit Antimycin, das einige Wochen bei -20°C aufbewahrt wurde, zu sehen. Man sieht deutlich einen zweiten Peak, neues Antimycin mußte synthetisiert werden.

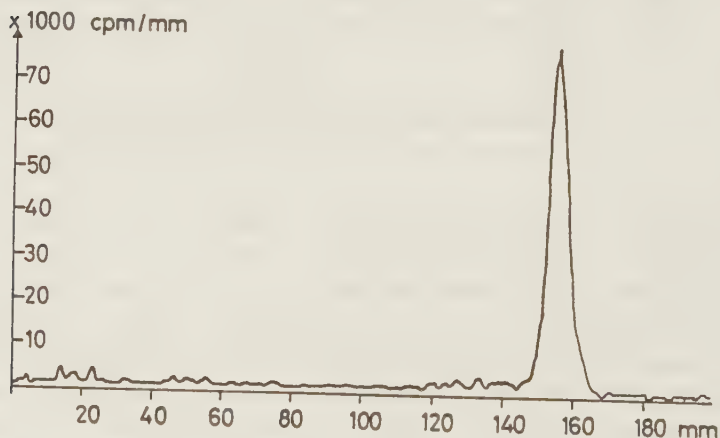


Abb. 22: Verteilung der Radioaktivität auf einem Dünnschichtchromatogramm, Laufmittel: Chloroform/Methanol 6/4, Probe: radioaktiv synthetisiertes Antimycin.

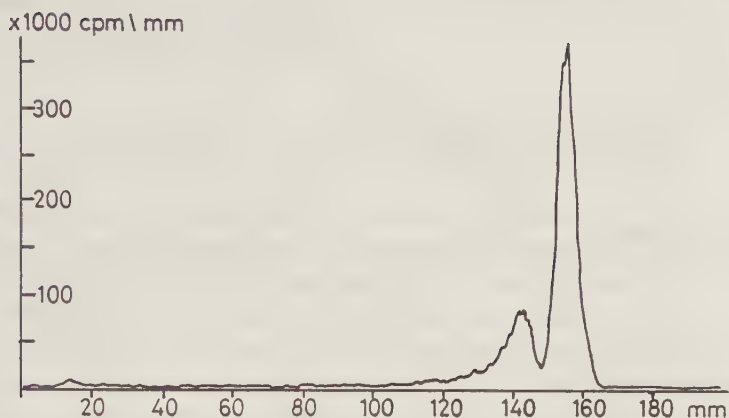


Abb. 23: Radioscan eines Dünnschichtchromatogramms von radioaktiv synthetisiertem Antimycin, das einige Wochen alt ist und aus dem Abbauprodukte entstanden sind.
 Laufmittel: Chloroform/Methanol 6/4.

Mit einem Isotopenverdünnungsversuch wurde überprüft, ob sich die gesamte Radioaktivität nur im Antimycin befindet und ob sich das synthetisierte, radioaktive Antimycin in Bindungsversuchen genauso wie das kalte, käufliche Antimycin verhält. Dafür wurde eine Lösung des radioaktiven Antimycins mit einem gleich großen Volumen an kalter Antimycinlösung (Sigma) mit gleicher Molarität versetzt, so daß die spezifische Aktivität des Antimycins nur noch halb so groß war wie bei den anderen Bindungsversuchen. Bei der Berechnung der freien und der gebundenen Antimycinmoleküls wurde der Umrechnungsfaktor entsprechend verdoppelt. In Abb. 24 sind die Bindungsexperimente mit Antimycin 'normaler' spezifischer Aktivität und halber spezifischer Aktivität dargestellt. Die Bindungskurven unterscheiden sich nicht. Daraus kann geschlossen werden, daß sich die Radioaktivität nur im Antimycin befindet und sich das radioaktive Antimycin in seinem Bindungsverhalten sich wie das käufliche Antimycin verhält.

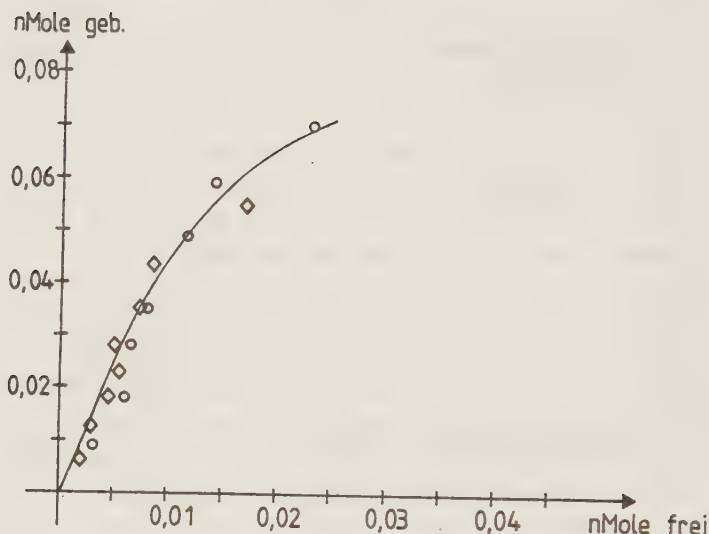


Abb. 24: Isotopenverdünnungsversuch. Bindung von ^3H -Antimycin mit 46 mCi/mMol (o) und mit 23 mCi/mMol (◊) an Rind-mitochondrien. Reaktionsbedingungen: 0.55 mg mitochondriales Protein/2 ml, 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5.

3.4.BINDUNGSEXPERIMENTE MIT RADIOAKTIVEM ANTIMYCIN

Mit dem radioaktiv synthetisierten Antimycin wurden Bindungsstudien an Chloroplasten und Mitochondrien und an isolierten Cytochrom bc Komplexen durchgeführt. Wie Tischer & Strotmann (1977) zeigten, besteht zwischen der Bindungskonstante k_B und der Inhibierungskonstante k_I für eine Testreaktion eines Hemmstoffs eine direkte Korrelation. Antimycinbindungsstudien geben deshalb Auskunft über die Affinität der Organellen bzw. der Komplexe zu Antimycin und über die Anzahl der Antimycinbindestellen. Berden & Slater (1972) und Mills et al (1978) führten Antimycinbindungsstudien mit Rinderherzmitochondrien und Spinatthylakoiden durch. Antimycin wurde dabei mit fluorimetrischer Methode bestimmt. Die Reaktionsmedien enthielten Rinderserumalbumin, da die Fluoreszenz von Antimycin durch Bindung an Rinderserumalbumin vergrößert wird und Rinder-serumalbumin Antimycin an den unspezifischen Bindungsstellen

verdrängen soll. Mit Hilfe des radioaktiven Antimycins war eine Bestimmung von Antimycin auch in sehr geringen Konzentrationen ohne Rinderserumalbumin möglich.

3.4.1. BINDUNG VON ANTIMYCIN AN RINDERMITOCHONDRIEN:

Der respiratorische Elektronentransport der für die Bindungsversuche verwendeten Rinderherzmitochondrien wurde bei einer Konzentration von 26 nM Antimycin, das aus den Streptomycetenkulturen isoliert worden war, zu 50 % gehemmt. Daraus ergibt sich bei 350 µg mitochondrialem Protein in 2 ml Testansatz und einem Gehalt von 542 nMolen Cytochromb-Häm pro µg Protein, daß 1 Mol Cytochrom b-Häm durch 0.54 Mole Antimycin gehemmt wird. Bei einem Versuch mit 140 µg mitochondrialem Protein in 2 ml Testansatz wird 1 Mol Cytochrom b-Häm durch 0.47 Mole Antimycin gehemmt, bei 70 µg mitochondrialem Protein genügen sogar 0.44 Mole Antimycin pro Mol Cytochrom b-Häm. Je weniger Protein im Testansatz enthalten ist, desto geringer ist die unspezifische Bindung von Antimycin an hydrophobe Membranproteine. Die Anzahl der Bindungsstellen konnte in Bindungskurven genauer ermittelt werden, als durch Extrapolation dieser Werte.

In Abb. 25 sind Bindungskurven von Antimycin an Rinderherzmitochondrien dargestellt. Die Bindungskurven haben einen Verlauf wie man ihn von einer Bindung eines hydrophoben Hemmstoffs an Membranen erwartet. Hierbei findet man nicht den Idealfall einer Sättigungskurve, da es nach der Absättigung der spezifischen, hochaffinen Bindestellen zu unspezifischen Bindungen an die hydrophobe Membran kommt. Die hochaffine Bindung von Antimycin an Rinderherzmitochondrien geht bei höheren Antimycinkonzentrationen in eine Bindung mit niedriger Affinität über. Aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften bindet Antimycin bei höheren Konzentrationen unspezifisch an hydrophobe Membranproteine, die Sättigungskurve der hochaffinen Bindung wird von unspezifischen Bindungen überlagert.

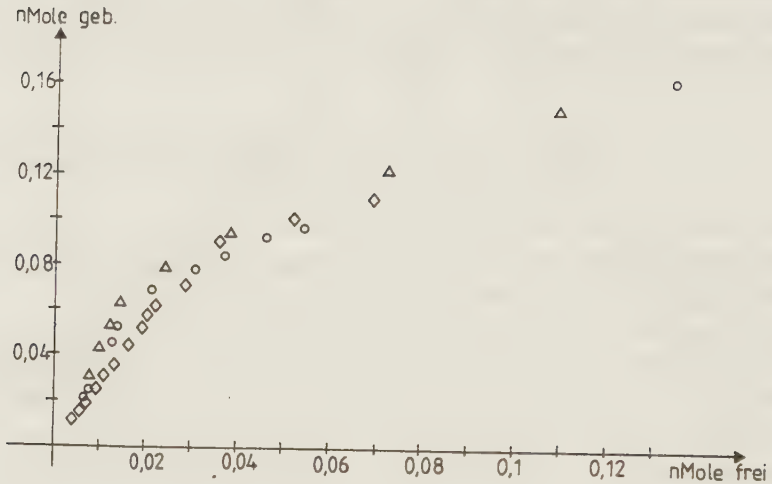


Abb. 25: Bindung von ^3H -Antimycin an Rindmitochondrien.
 Reaktionsmedium: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA. Bei (◇) 0.505 mg mitochondriales Protein/2 ml, ^3H -Antimycin aus 1.Synthese. Bei (○) und (△) 0.55 mg mitochondriales Protein/2 ml, ^3H -Antimycin aus 2.Synthese.

Alle drei dargestellten Bindungsexperimente wurden unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt, die mit (◇) gekennzeichnete Bindungskurve wurde mit Antimycin erhalten, das aus einem anderen Syntheseansatz stammt als das bei den mit (○) und (△) gezeichneten parallelen Bindungsversuchen verwendete Antimycin. Alle drei Experimente führen zur selben Bindungskurve. Für die Bestimmung der Bindungskonstante wurden die Daten im Scatchard Plot aufgetragen (Abb. 26).

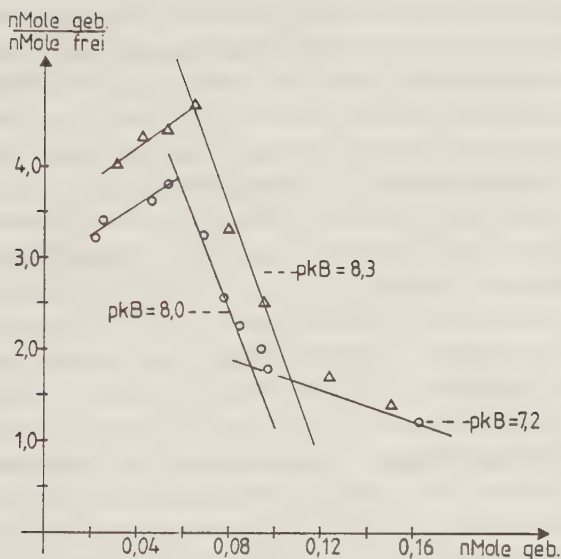


Abb. 26: Scatchardauftragung der ^3H -Antimycinbindung an Rind-mitochondrien. Reaktionsbedingungen wie für (o) und (Δ) in Abb. 25 beschrieben.

Dabei werden die gebundenen Antimycinmoleküle gegen das Verhältnis gebundene zu ungebundene Antimycinmoleküle aufgetragen. Die positive Steigung der Kurve im hochaffinen Bereich deutet auf eine positiv kooperative Bindung hin, wie dies bereits Berden & Slater 1972 an reduzierten, submitochondrialen Partikeln beobachteten. Im Scatchard Plot kann für diesen Bereich jedoch keine Bindungskonstante ermittelt werden. Im weiteren Verlauf der Kurve erkennt man deutlich zwei Geraden mit negativen Steigungen, die Bindung mit hoher und die mit niedriger Affinität. Der pkB Wert, der negative, dekadische Logarithmus der Bindungskonstante, für die hochaffine Bindung ist 8.3, der für die niedrigaffine 7.2. Die Werte, die im Scatchard Plot die Gerade mit dem km Wert von 15 nM ($=\text{pkB}$ 8.3) bilden, liegen auf der Bindungskurve im dem Bereich, in dem die Bindungen mit hoher Affinität bereits von der mit niedriger Affinität überlagert wird. Da jedoch die Werte im hochaffinen

Bereich bei einer positiv kooperativen Bindung zwei Binde-
stellen mit unterschiedlicher Affinität wiedergeben, sollen,
zum Vergleich der verschiedenen Membransysteme untereinander
und der Literaturwerte, die pK_B Werte, die die Bindung mit der
höchsten Affinität beschreiben als Richtwerte gelten. Die
Anzahl der Bindestellen war 0.125 nMole in einem Testansatz,
der 0.505 mg mitochondriales Protein enthielt. Das nMol
Cytochrom b-Häm zu mg Protein Verhältnis der verwendeten Mito-
chondrien war 0.495, daraus folgt, daß 0.5 Mole Bindestellen
pro Mol Cytochrom b-Häm vorhanden waren. Die Anzahl der
Antimycinbindestellen bezogen auf Cytochrom b bestätigt die
Resultate von Berden & Slater (1972), die jedoch für oxidierte
Rinderherzmitochondrien einen pK_B Wert von 9.5 angeben. Die
Bindungskonstanten wurden von Berden & Slater (1972) mit der
fluorimetrischen Methode in Anwesenheit von Rinderserumalbumin
bestimmt, hierbei wird die Bindungskonstante von Antimycin an
Rinderherzmitochondrien mit der Bindungskonstante von Antimycin an
Rinderherzmitochondrien verrechnet. Die Antimycinbindung an
oxidierte Mitochondrien (1 mM Fecy) hat im hochspezifischen
Bereich denselben Verlauf wie die an unbehandelte Rinder-
herzmitochondrien, die wahrscheinlich auch in Abwesenheit von
Fecy oxidiert vorliegen (Abb. 27).

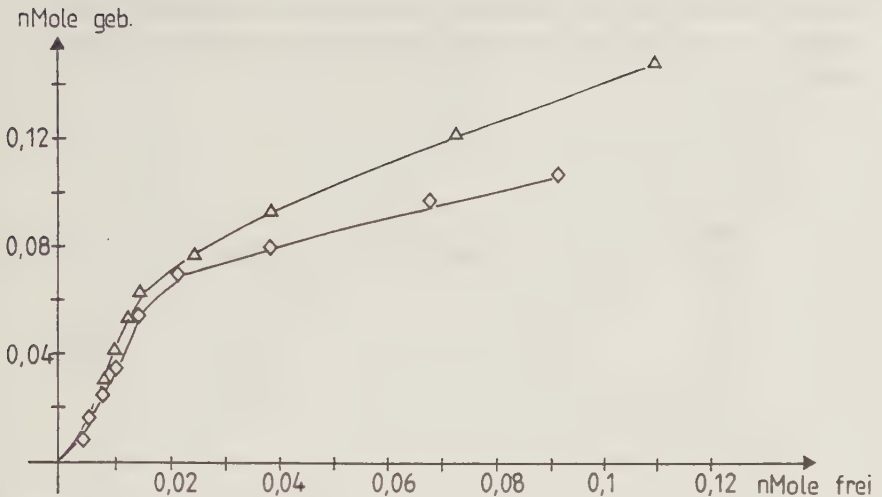


Abb. 27: Bindung von ^3H -Antimycin an oxidierte (◇) und an unbehandelte (Δ) Rindmitochondrien. Bei (◇) 0.55 mg/2ml mitochondriales Protein, Reaktionsmedium: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 1 mM Kaliumferricyanid. Bei (Δ) 0.55 mg/2 ml mitochondriales Protein, Reaktionsmedium: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA.

Die Bindung von Antimycin an Rinderherzmitochondrien mit 1 mg Rinderserumalbumin/ml Reaktionsansatz ist in Abb. 28 abgebildet. Die Darstellung nach Woolf-Augustinsson-Hofstee (Abb. 29) berücksichtigt im Gegensatz zu der nach Scatchard die Menge des im Testansatz enthaltenen Proteins, es werden die gebundenen Moleküle bezogen auf 1 mg Protein gegen das Verhältnis der gebundenen zu freien Moleküle, die ebenfalls auf 1 mg Protein bezogen werden, aufgetragen. In dieser Darstellung sieht man, daß Bindungen an Rindermitochondrien in An- bzw. in Abwesenheit von Rinderserumalbumin eine ähnliche Kinetik zeigen (Abb. 29). Der pkB ist in Anwesenheit von Rinderserumalbumin 7.5, der kB Wert ist damit ungefähr um einen Faktor 6 größer als in Abwesenheit von Rinderserumalbumin. Bei dieser Auswertung wurde die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin nicht berücksichtigt. Der pkB Wert entspricht dem, der

von Berden & Slater als apparenter pK_B Wert angegeben wird, damit ist der pK_B Wert gemeint, bei dessen Kalkulation die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin unberücksichtigt ist.

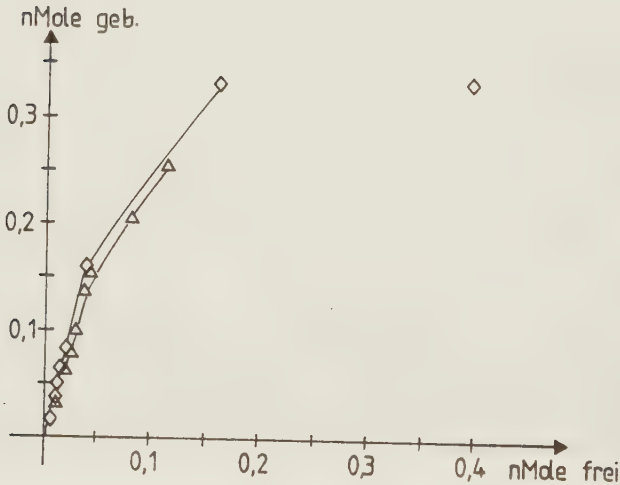


Abb. 28: Bindung von 3H -Antimycin an Rindmitochondrien mit Rinderserumalbumin, Parallelversuche. Reaktionsbedingungen: 2.1 mg/2 ml mitochondriales Protein, 20 mM TRICIN pH 8.0, 20 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml Rinder-serumalbumin.

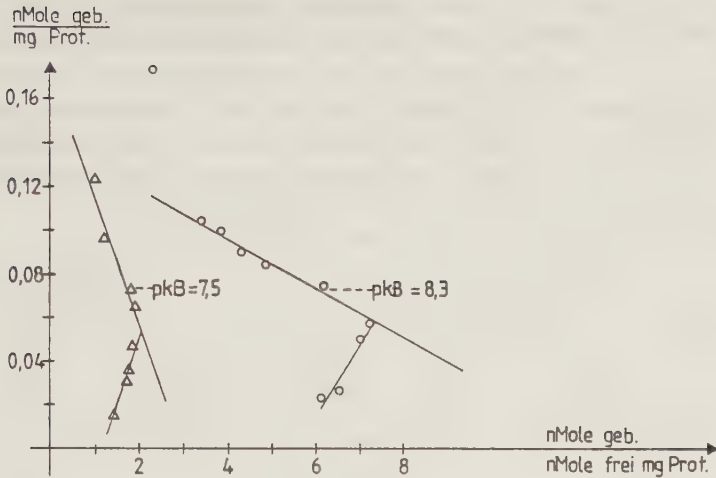


Abb. 29: Woolf-Augustinsson-Hofstee Auftragung der ^3H -Antimycinbindung an Rindmitochondrien mit (Δ) und ohne ($\circ$) Rinderserumalbumin im Reaktionsmedium. Reaktionsbedingungen für (Δ): 2.1 mg mitochondriales Protein/2 ml, 20 mM TRICIN pH 8.0, 20 mM MgCl_2 , 1 mg/ml Rinderserumalbumin; für ($\circ$): 0.55 mg mitochondriales Protein/2 ml, 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA.

Die Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in Rinderherzmitochondrien durch Antimycin unterscheidet sich bei 350 μg eingesetztem mitochondrialem Protein in 2 ml Reaktionsansatz bei 1 mg Rinderserumalbumin/ml nicht von der in Abwesenheit von Rinderserumalbumin.

3.4.2. BINDUNG VON ANTIMYCIN AN HEFEMITOCHONDRIEN:

In Mitochondrien, die aus bei Uniform bezogener Hefe isoliert wurden, wurde die Antimycinbindung charakterisiert. Bei 170 μg mitochondrialem Protein in 2 ml Reaktionsansatz wurden bei einer Konzentration von 12 nM Antimycin 50 % des respiratorischen Elektronentransports in diesen Mitochondrien gehemmt. Die Bindung von Antimycin an Hefemitochondrien in Abwesenheit

von Rinderserumalbumin ist in Abb. 30 dargestellt, die Scatchard Auftragung dieser Bindung in Abb. 31.

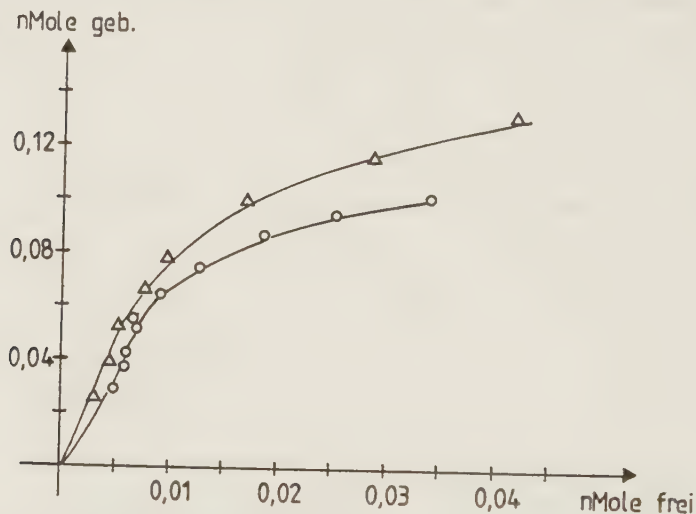


Abb. 30: Bindung von ^3H -Antimycin an Hefemitochondrien, Parallelversuche. Reaktionsbedingungen: 1 mg/2 ml mitochondriales Protein, 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA

Aus der Scatchard Auftragung ergibt sich ein pK_B der hochspezifischen Bindung von 8.4 bzw. 8.6, im hochaffinen Bereich liegen auch bei Hefemitochondrien die Werte, die bei sehr niedrigen Konzentrationen erhalten werden, auf einer Gerade mit positiver Steigung. Die Bindung von Antimycin an Hefemitochondrien verläuft demnach ebenso wie die an Rindermitchondrien positiv kooperativ. Die Anzahl der Bindestellen beträgt 0.13 nMole/1 mg mitochondrialem Protein, das pro Testansatz enthalten war. Bei einem nMole Cyt b-Häm zu mg Protein Verhältnis von 0.31 folgt daraus, daß auf ein Mol Cyt b-Häm 0.42-0.48 Mole Antimycinbindestellen kommen. Die in den Antimycinbindungsstudien ermittelten pK_B Werte für Rinder- und Hefemitochondrien liegen ebenso in der gleichen Größenordnung wie die ermittelten pI_{50} Werte. Die Anzahl der Mole Bindestellen pro Mol Cytochrom b-Häm variierte von Präparation zu

Präparation beträchtlich, was wahrscheinlich darauf beruht, daß nicht alle bestimmaren Cytochrome b in den verschiedenen Mitochondrienpräparationen gleichermaßen intakt waren oder, weniger wahrscheinlich, daß die Cytochrombestimmung in den Mitochondrien zu starken Schwankungen unterliegt. Der pK_B hingegen ist bei allen Präparationen gleich.

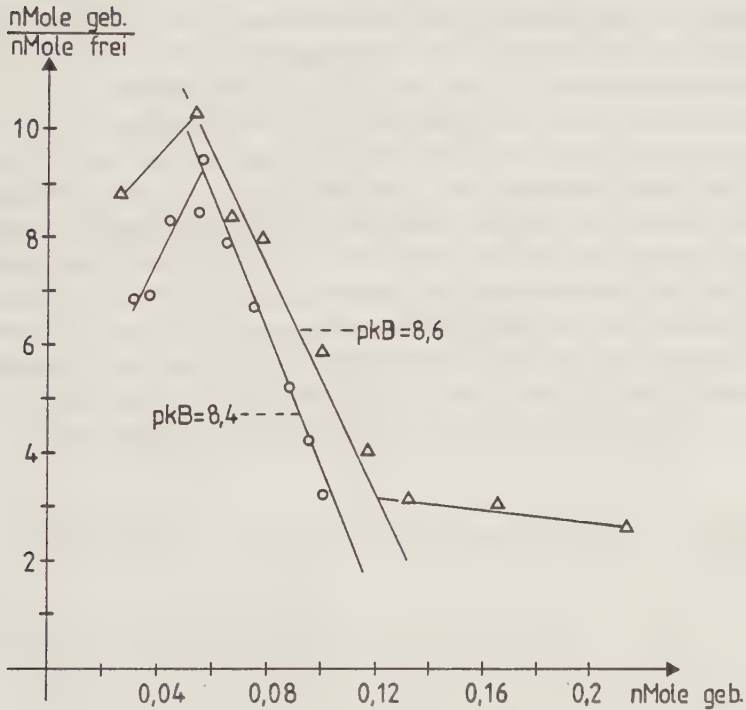


Abb. 31: Scatchardauftragung der 3H -Antimycinbindung an Hefemitochondrien. Reaktionsbedingungen siehe Abb. 30.

3.4.3. BINDUNG VON ANTIMYCIN AN SPINATTHYLAKOIDE UND AN PHOTOSYSTEM II PARTIKEL:

Da Antimycin in Spinatthylakoiden nur den Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport hemmt, vermutet man, daß Antimycin entweder am Photosystem I oder am Cytochrom b₆f Komplex bindet. Die ATP Synthese wurde bei den für die Bindungsversuche verwendeten Spinatthylakoiden im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport bei 0.14 μ M zu 50 % gehemmt. In Abb. 32 sind zwei Bindungsversuche an Spinatthylakoide dargestellt. Im Vergleich zu den Rinder- und Hefemitochondrien fällt auf, daß es bei einer Auftragung nach Woolf-Augustinsson-Hofstee im hochaffinen Bereich keine Gerade mit positiver Steigung gibt, die auf eine kooperative Bindung deuten würde. Die Antimycinbindung hat den bei Herbizidbindung an Spinatthylakoiden typischen Verlauf, die hochaffine Bindung wird im Sättigungsbereich von einer unspezifischen Bindungen überlagert. Der pK_B Wert für Antimycin ist in Spinatthylakoiden 7.3, der K_B Wert ist damit in Spinatthylakoiden um einen Faktor 10 größer als in Hefe- bzw Rinderherzmitochondrien und entspricht dem der niedrigaffinen Bindung in Mitochondrien.

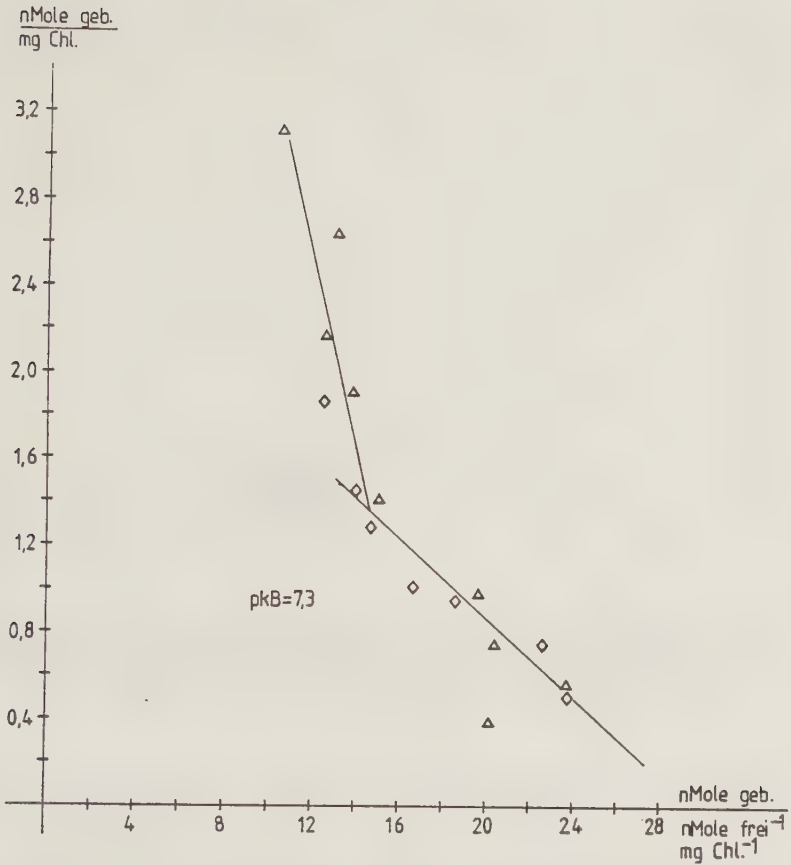


Abb. 32: ^3H -Antimycinbindung an Spinatthylakoide. Darstellung nach Woolf-Augustinsson-Hofstee. Reaktionsbedingungen: 50 μg Chlorophyll/2 ml, Medium bei (◇) 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA; bei (Δ) wurde TRIS durch TRICIN ersetzt.

Mit Rinderserumalbumin (1 mg/ml) erhält man bei Spinatthylakoiden den gleichen pKB Wert wie in Abwesenheit von Rinderserumalbumin, obwohl bei der Berechnung der Bindungskonstante die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin nicht berücksichtigt wurde (Abb. 33).

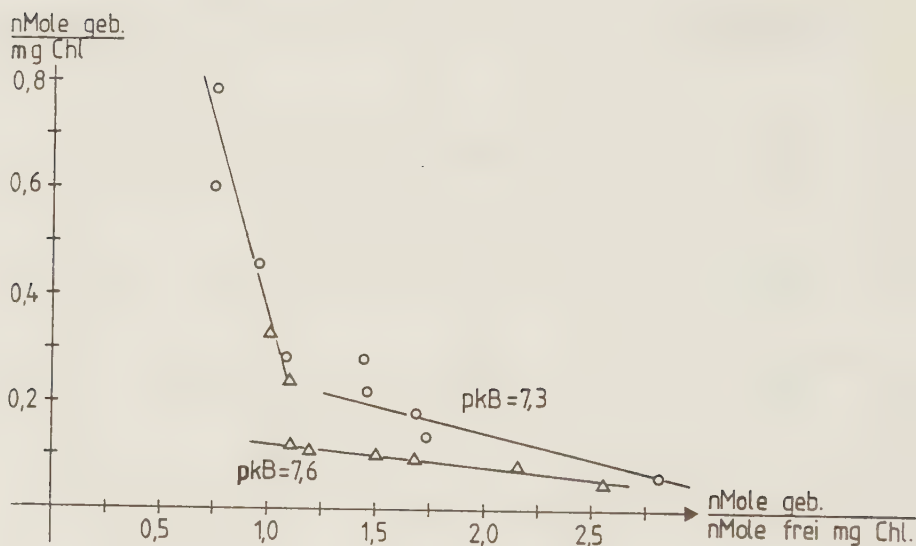


Abb. 33: Bindung von ^3H -Antimycin an Spinatthylakoide in Anwesenheit von Rinder serumalbumin, Parallelversuche. Darstellung nach Woolf-Augustinsson-Hofstee. Versuchsbedingungen: 50 μg Chlorophyll/2 ml, 20 mM TRICIN pH 8.0, 20 mM MgCl_2 .

Da nur der ferredoxinabhängige, zyklische Elektronentransport durch Antimycin gehemmt wird und an diesem Photosystem II Partikel nicht beteiligt sind, gibt es keinen Anlaß zu der Vermutung, daß Antimycin an Photosystem II Partikel bindet. Mit Bindungsversuchen an Photosystem II Partikeln und Photosystem I Partikeln sollte überprüft werden, ob die in Spinatthylakoiden beobachtete Antimycinbindung die Bindungskinetik wiedergibt, die für die Hemmung des Ferredoxin abhängigen zyklischen Elektronentransports verantwortlich ist. Photosystem II Partikel (BBY Partikel), die nach Berthold et al (1981) hergestellt wurden, enthielten keinen nachweisbaren Cytochrom b_6f Komplex, bei der Hämefärbung wurde weder Cytochrom f noch Cytochrom b angefärbt. (Abb. 34).

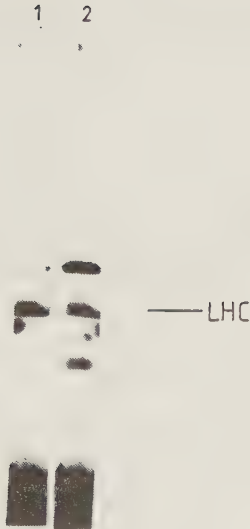


Abb. 34: 15 % SDS PAGE, Hämefärbung, 1= Photosystem II (BBY) Partikel, 2= Spinatthylakoide, LHC= light harvesting complex ist in beiden Proben vorhanden und ist als mittlere Bande zu sehen.

Die mit den BBY Partikeln erhaltenen Bindungskurven sind in Abb. 35a/b zusammen mit den mit Spinatthylakoiden erhaltenen Bindungskurven dargestellt. Der Verlauf der Bindungskurven ist in Thylakoiden und in BBY Partikeln wider Erwarten gleich. Eine Auftragung der Bindungsdaten an BBY nach Scatchard ist in Abb. 36 wiedergegeben. Die beiden Bindungsversuche führen zu einem pK_B Wert von 8.1, der damit entgegen der Erwartung größer ist als der für die Spinatthylakoide bestimmte pK_B Wert. Die Bindung von Antimycin an Spinatthylakoide hat einen anderen Verlauf als die an Mitochondrien. Die nicht zu erklärende Bindung von Antimycin an BBY Partikel legt den Schluss nahe, daß es sich bei der Bindung an Spinatthylakoide nicht um eine Bindung handelt, die für die Hemmung des Ferredoxin abhängigen Elektronentransports verantwortlich ist oder diese zumindest von einer Antimycinbindung überlagert wird, die in BBY Partikeln gleichermaßen vorliegt, die jedoch nicht zu einer

Hemmung des Elektronentransports in Photosystem II führt.

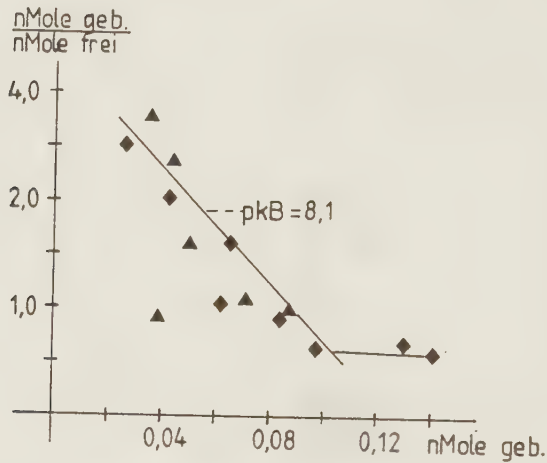


Abb. 36: Auftragung der Bindung von ^3H -Antimycin an Photosystem II Partikel nach Scatchard, Parallelversuche. Versuchsbedingungen: 25 μg Chlorophyll/ml, 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA.

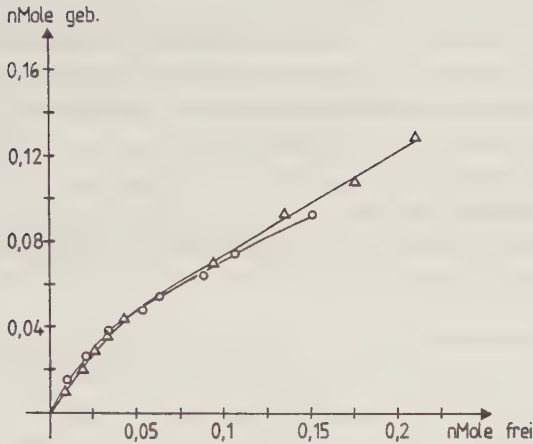
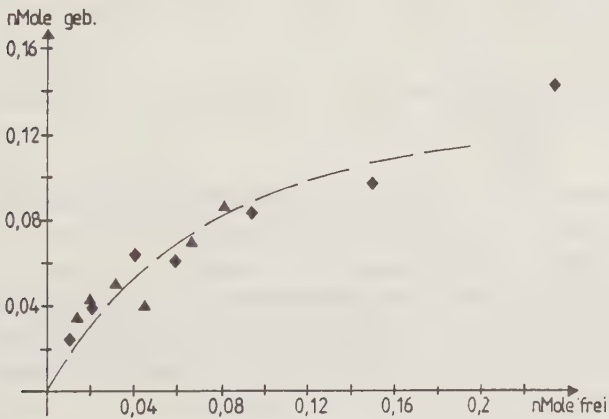


Abb. 35: Bindung von ^3H -Antimycin an

a) Spinatthylakoide und b) an Photosystem II Partikel aus Spinat.

a) 50 μg Chlorophyll/2 ml. Bei (Δ) Medium: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRICIN pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, ^3H -Antimycin aus 1. Synthese; bei ($\circ$) Medium: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 2. ^3H -Antimycinsynthese.



b) Parallelversuche, Medium wie bei ($\circ$), 125 μg Chlorophyll/5 ml.

3.4.4. BINDUNG VON ANTIMYCIN AN PHOTOSYSTEM I VESIKEL:

In Zusammenarbeit mit Dr. K. Krab, Amsterdam wurden Photosystem I Vesikel präpariert und deren Aktivität im Ferredoxin abhängigen zyklischen Elektronentransport gemessen. Sie enthalten Photosystem I und Cytochrom b_6f Komplex. Die Vesikel wurden bei einer Konzentration von 4 μM Antimycin zu 22 %, bei 11 μM zu 40 % gehemmt. In Abb. 37 ist die Bindung von Antimycin an die Photosystem I Vesikel zusammen mit einer Bindung an Spinatthylakoide dargestellt.

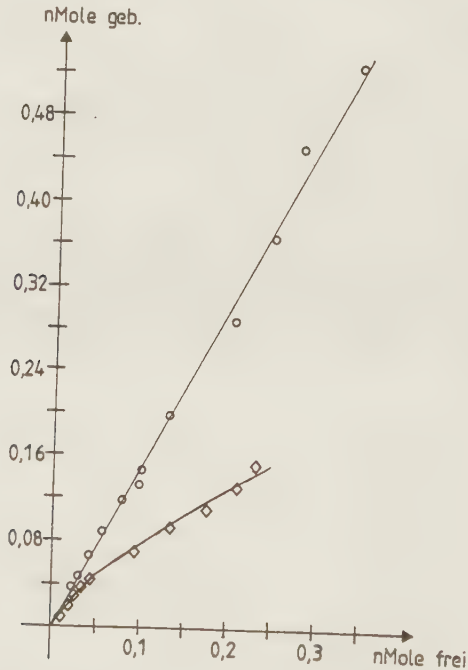


Abb. 37: Bindung von ^3H -Antimycin an Photosystem I Vesikel aus Spinat (○), Reaktionsbedingungen: 0.125 mg Chlorophyll/5ml, 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA. Zum Vergleich Bindung an Spinatthylakoide (◇), Reaktionsbedingungen: 50 μg Chlorophyll/2ml, 0.25 M Saccharose, 50 mM TRICIN pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA.

Der Verlauf der Bindungskurve ist bei Photosystem I Vesikeln

vollständig anders als bei Thylakoiden. Auch bei hohen Konzentrationen von Antimycin knickt die Bindungskurve nicht ab. Auch bei der Auftragung nach Woolf-Augustinsson-Hofstee kann entgegen der Erwartungen keine spezifische Bindung erkannt werden.

3.4.5. BINDUNG VON ANTIMYCIN AN ISOLIERTE CYTOCHROM bc KOMPLEXE:

Die Bindungen von Antimycin an Rinderherz- und Hefemito-chondrien führten zu pK_B Werten, wie man sie nach den pI_{50} Werten erwarten würde. Die Bindungsversuche mit Thylakoiden, BBY und Photosystem I Vesikeln lassen die Frage unbeantwortet, an welchen Proteinkomplex der photosynthetischen Membran Antimycin bindet und dort die Hemmung des Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransports bewirkt. Mit Hilfe von Bindungsversuchen am isolierten Cytochrom b_6f Komplex im Vergleich zu Bindungsversuchen an Cytochrom bc_1 Komplexen könnte geklärt werden, ob Antimycin am b_6f Komplex bindet oder nicht. Eine hochspezifische Bindung an Cytochrom b_6f könnte bei den Bindungsversuchen mit Thylakoiden durch die unspezifischen Bindungen überdeckt sein.

3.4.5.1. Abtrennung der Cytochrom bc Komplexe vom Reaktionsmedium:

Für Bindungsstudien muß eine quantitative, reproduzierbare Abtrennung der Proteinkomplexe mit dem daran gebundenen Hemmstoff von dem freien, im Reaktionsmedium vorliegenden Hemmstoff erfolgen. Mitochondrien, Thylakoide und Photosystem I und II Vesikel können aufgrund ihrer Größe durch Zentrifugation ohne Probleme pelletiert werden. Die Cytochrom bc Komplexe haben aber nur ein Molekulargewicht von 180 - 500 kD und konnten dementsprechend nicht während einer zweistündigen Zentrifugation bei 485 000 g im SW 60 Ti Rotor pelletiert werden. Zunächst wurde versucht, die Cytochromkomplexe durch

kleine Gelfiltrationssäulen von den freien Hemmstoffmolekülen abzutrennen. Die Menge der aufgetragenen und der wiedergefundenen Proteinkomplexe wurde mit Redoxdifferenzspektren bestimmt, unter gleichen Bedingungen wurde parallel der Verbleib des Antimycins mit fluorimetrische Methode verfolgt. Bei allen verwendeten Säulenmaterialien (Sephadex G 50, Sephacryl S 300, Biogel P 100) konnten nicht 100 % des aufgetragenen Cytochrom bc Komplexes wieder gefunden werden und die Wiederfindungsrate schwankte. Außerdem kam Antimycin so verdünnt von der Säule, daß das Volumen für die Zählung der Radioaktivität hätte eingeeengt werden müssen, um eine genaue Bestimmung der ungebundene Hemmstoffmoleküle zu gewährleisten. Von einer Dialysemethode wurde Abstand genommen, da die Cytochromkomplexe bei Raumtemperatur in verdünntem Zustand instabil sind und diese Methode mehrere Stunden dauert. Mit Hilfe des Vertikalrotors RP 67 V war es schließlich möglich die Cytochromkomplexe während einer 2.25 stündigen Zentrifugation zu pelletieren. Im Überstand war kein Cytochrom bc₁ bzw. b₆f Komplex nachweisbar, entsprechend der Nachweisgrenze könnte sich höchstens 1.5 % des im Gesamtvolumen enthaltenen Komplexes im Überstand befinden.

3.4.5.2. Bindung von Antimycin an Cytochrom bc Komplexe:

Die Bindung von Antimycin an isolierten Cytochrom bc₁ Komplex aus Rindermitochondrien ist in Abb. 38 dargestellt. Man erkennt deutlich eine Bindung mit hoher und eine mit niedriger Affinität. Die Bindungskurve konnte in einem zweiten Experiment bestätigt werden. Zum Vergleich sind in derselben Abbildung zwei Bindungsversuche mit Antimycin an Cytochrom b₆f Komplex aus Spinat dargestellt. Es ist keine spezifische Bindung zu erkennen. Die Experimente wurden mit Cytochrom b₆f Komplexen, die aus zwei Präparationen stammen, durchgeführt. Beide Cytochrom b₆f Komplex Chargen binden Antimycin nur unspezifisch.

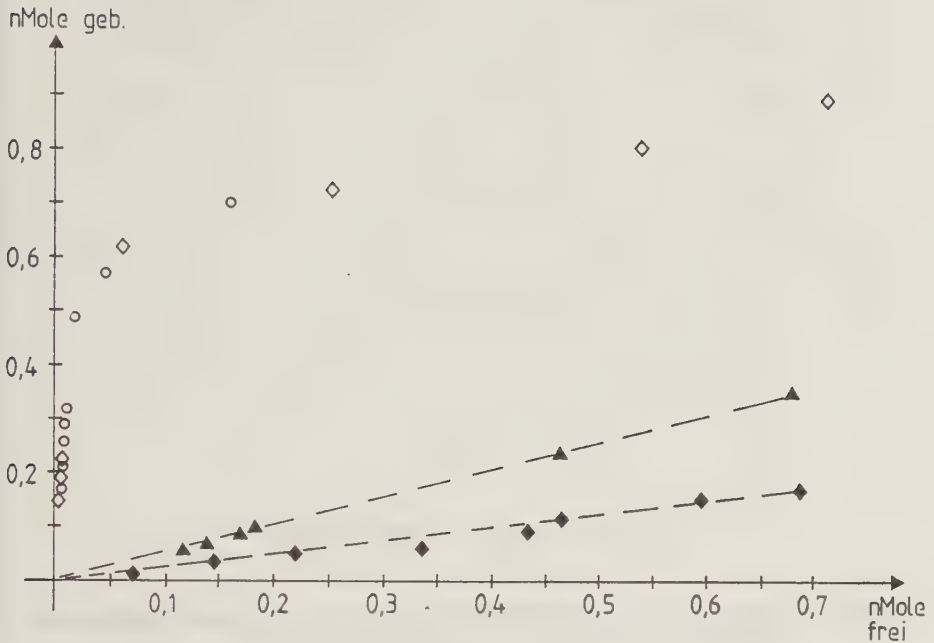


Abb. 38: Bindung von ^3H -Antimycin an Cytochrom bc_1 Komplex aus Rindermitchondrien, Parallelversuche ($\diamond$) und ($\circ$), und an Cytochrom b_5f Komplex aus Spinat, Präparation I ($\blacklozenge$) und Präparation II ($\blacktriangle$). Versuchsbedingungen: 1.66 nMole Cytochrom b/5 ml.

In Abb. 39 sind die Bindungsdaten der Versuche mit dem Cytochrom bc_1 Komplex aus Rindermitchondrien nach Scatchard aufgetragen. Im Bereich der hochaffinen Bindung tritt genau wie bei den Bindungsversuchen mit Rinder- und Hefemitchondrien eine Gerade mit positiver Steigung auf, die auf eine kooperative Bindung hinweist. Der pK_B Wert ist 9.0, die Anzahl der Bindestellen ist 0.4 Mole pro Mol Cytochrom b-Häm.

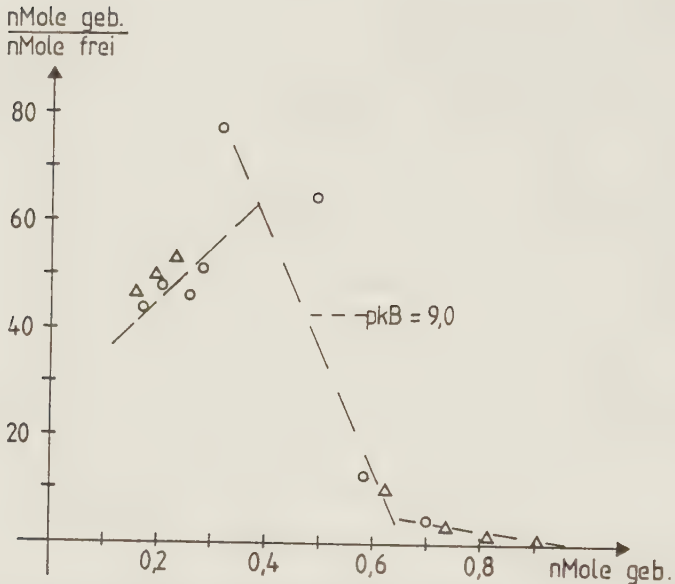


Abb. 39: Bindung von ^3H -Antimycin an Cytochrom bc_1 Komplex aus Rindermitchondrien, Scatchardauftragung, 1.66 nMole Cytochrom b-Häm/5 ml

Da der Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe ebenso wie der Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind im Gegensatz zu dem Cytochrom b_6f Komplex aus Spinat antimycinempfindlich ist, wurde die Bindung von Antimycin auch am Cytochrom bc_1 komplex aus Hefe untersucht. In Abb. 40 ist dieser Bindungsversuch im Scatchard Plot abgebildet. Auch bei diesem Bindungsversuch liegen die Werte der hochaffinen Bindung auf einer Geraden mit positiver Steigung, der pkB Wert ist mit 9.8 etwas höher als der von Rind. Deutlich wird auch hier der Unterschied zum Cytochrom b_6f Komplex, der Antimycin nur unspezifisch bindet.

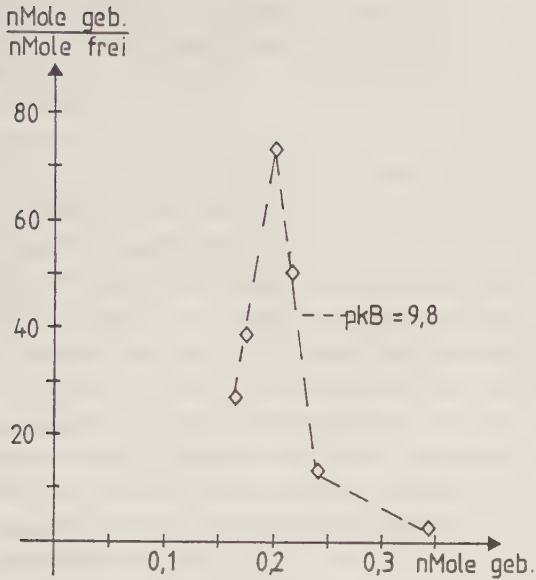


Abb. 40 : Bindung von ^3H -Antimycin an Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe, Scatchardauftragung, 3 nMole Cytochrom b-Häm/5 ml.

3.5. SYNTHESE VON RADIOAKTIVEM DEFORMAMIDOAZIDOANTIMYCIN:

Das radioaktiv synthetisierte Antimycin bot die Möglichkeit daraus ein radioaktives Deformamidoazidoantimycin zu synthetisieren, mit dem in Photoaffinitätsmarkierungen das Antimycinbindeprotein in Thylakoiden und Mitochondrien identifiziert werden könnte. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, hemmte das aus käuflichem Antimycin synthetisierte Deformamidoazidoantimycin den mitochondrialen Elektronentransport bei 90 nM zu 50 % und erschien somit für Photoaffinitätsmarkierungen als geeignet. Aus Streptomycetenkulturen wurde Antimycin isoliert und zu Deformylantimycin umgewandelt. Bei der darauffolgenden Diazotierung bildete sich eine rote Substanz, wahrscheinlich eine Diazoverbindung; die Synthese von Deformamidoazidoantimycin gelang aus dem isolierten Antimycin nicht. Dies kann zum einen auf der unterschiedlichen Zusammensetzung der

Antimycinisomere in dem gekauften und dem isolierten Antimycin beruhen (siehe 3.3.2.3), zum anderen könnte eine geringe Verunreinigung, die vielleicht in dem isolierten Antimycin enthalten war, die Reaktion gestört haben.

3.6. VERDRÄNGUNG VON [^3H]-ANTIMYCIN DURCH ANDERE HEMMSTOFFE:

Läßt sich Antimycin durch einen anderen Hemmstoff von seiner Bindungsstelle verdrängen, so ist dies ein Hinweis darauf, daß dieser Hemmstoff und Antimycin dieselbe oder wenigstens eine überlappende Bindungsstelle haben. Die Antimycinbindungsstudien an Spinatthylakoiden, an Photosystem II (BBY) und an Photosystem I Vesikel konnten keine Antwort auf die Frage geben, an welche der Proteinkomplexe Antimycin bindet. Am Cytochrom b_6f Komplex war keine spezifische Bindung zu beobachten. Ein Hemmstoff, der sich infolge anderer Experimente antimycin-ähnlich verhält, bietet die Möglichkeit in Verdrängungsexperimenten mit Spinatthylakoiden und Photosystem II Partikeln die Antimycinbindestelle zu untersuchen.

3.6.1. VERDRÄNGUNGEN MIT THBP:

Hartung & Trebst (1985) zeigten, daß Tetrabrom-4-hydroxypyridin (=J 820), hier mit THBP abgekürzt, den Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport hemmt und die $\text{ATP}/2e^-$ Stöchiometrie im nicht zyklischen Elektronentransport mit Durochinol als Donor verringert. THBP verhält sich damit in Spinat wie Antimycin. Wenn THBP Antimycin in Spinatthylakoiden verdrängen kann, so bedeutet dies, daß die beiden Hemmstoffe zumindest eine überlappende Bindungsstelle haben. In dem Verdrängungsexperiment wurden die Spinatthylakoide mit 0.01 nMol Antimycin, eine Konzentration, die in dem Bereich der 'hoch spezifischen' Bindung liegt, vorinkubiert und dann THBP in Konzentrationen von $5 \text{ }\mu\text{M}$ bis $100 \text{ }\mu\text{M}$ zugegeben. THBP kann Antimycin nicht nachweisbar verdrängen, die Menge des gebundenen Antimycin war in allen Proben gleich. Dies kann

einmal darauf zurückzuführen sein, daß die beiden Hemmstoffe unterschiedliche Bindungsstellen haben, oder aber, daß die hochspezifische Bindung von Antimycin an Spinatthylakoide im Vergleich zu der auch bei dieser Konzentration vorliegenden niedrigspezifischen so klein ist, daß die Menge an hochspezifisch gebundenen Antimycinmoleküle, die durch THBP verdrängt werden, innerhalb der Messchwankungen liegen. Derselbe Verdrängungsversuch wurde in Anwesenheit von 1 mg/ml Rinderserumalbumin durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 41 dargestellt.

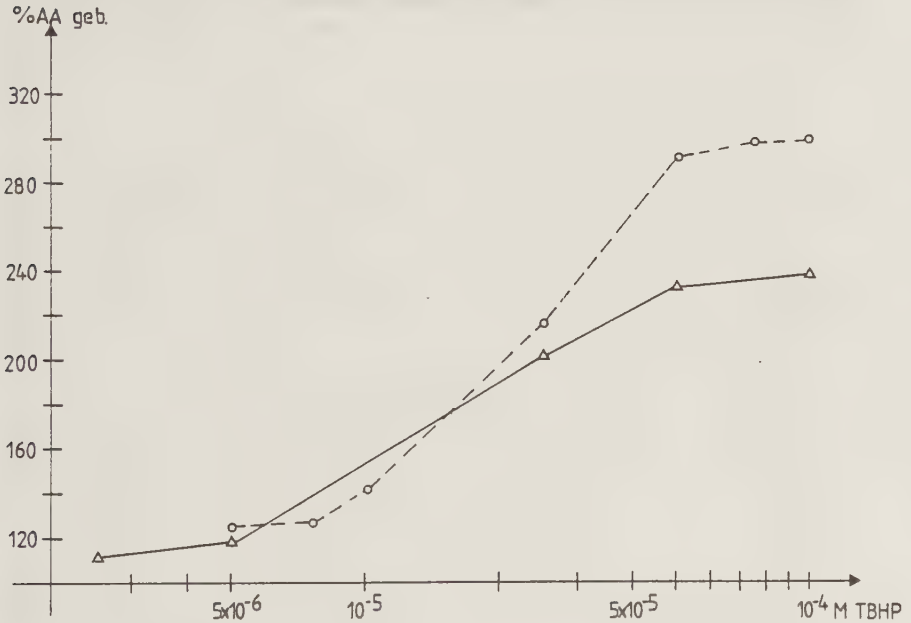


Abb. 41: Verdrängung von [3 H]-Antimycin (0.23 nMole/2ml) durch THBP (Δ), und Verdrängung von THBP durch [3 H]-Antimycin (0.23 nMole/2 ml) (○) in Spinatthylakoiden. Reaktionsbedingungen: 20 mM TRICIN pH 8.0, 20 mM $MgCl_2$, 1 mg Rinderserumalbumin/ml, 50 μ g Chlorophyll/2 ml.

THBP führt in Anwesenheit von Rinderserumalbumin zu einer deutlichen Zunahme der Antimycinbindung. Möglicherweise führt

die Bindung von THBP zu einer Konformationsänderung, die die Affinität der Antimycinbindestelle erhöht. Der Unterschied zwischen den Verdrängungsversuchen in An- bzw in Abwesenheit von Rinderserumalbumin kann damit allerdings nicht erklärt werden und macht deutlich, wie stark der Einfluß von Rinder-serumalbumin auf die Bindung von Hemmstoffen sein kann. In einem parallelen Versuch wurde die Verdrängung von THBP durch Antimycin in Hefemitochondrien in Anwesenheit von 1 mg Rinder-serumalbumin/ml beobachtet. Die Antimycinkonzentration wurde mit 0.1 nMol/2 ml aus dem hochspezifischen Bereich gewählt. Wie bei Spinatthylakoiden führt THBP in Hefemitochondrien mit steigenden Konzentrationen zu einer Zunahme des gebundenen Antimycins (Abb. 42).

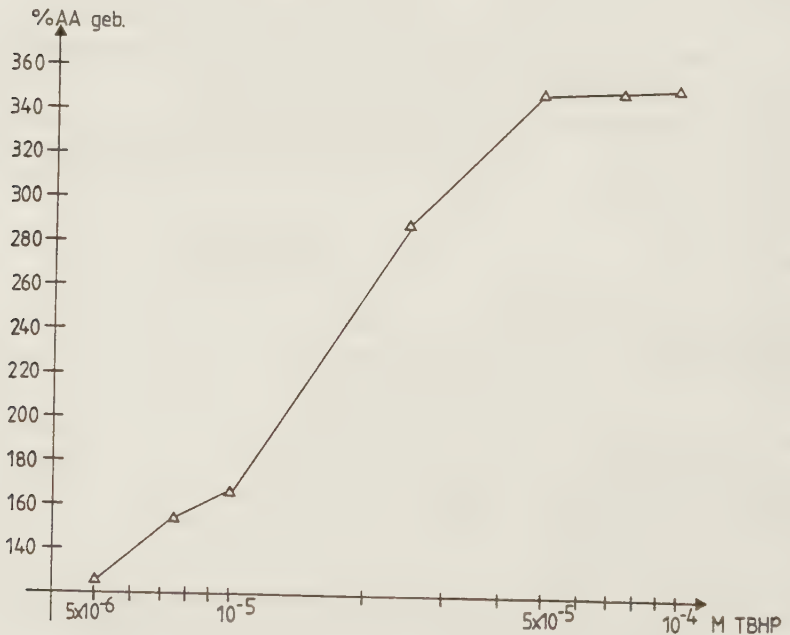


Abb. 42: Verdrängung von [^3H]Antimycin (0.1 nMole/2 ml) durch THBP in Hefemitochondrien. Reaktionsbedingungen: 20 mM TRICIN pH 8.9, 20 mM MgCl_2 , 1 mg/ml Rinderserumalbumin, 0.525/2ml mitochondriales Protein.

Die Verdrängung von Antimycin durch THBP wurde auch in Rinderherzmitochondrien in Abwesenheit von Rinder Serumalbumin untersucht. Antimycin lag in einer Konzentration von 0.072 nMole/2 ml vor, eine Konzentration im hochspezifischen Bereich. Selbst bei einer Konzentration von 100 μ M konnte THBP nur 5 % des gebundenen Antimycins verdrängen, dies bestätigt die Resultate der Versuche mit Spinatthylakoiden. 10 μ M THBP hemmten 38 % des respiratorischen Elektronentransports. THBP stellt damit in Rinderherz- und Hefemitochondrien einen wesentlich schlechteren Hemmstoff als Antimycin dar, zeigt jedoch in Mitochondrien bei Verdrängungsexperimenten dieselben Effekte wie in Spinatthylakoiden.

3.6.2. VERDRÄNGUNG VON [3 H]-ANTIMYCIN DURCH DCMU:

Mit einem Verdrängungsexperiment an Photosystem II Partikeln sollte überprüft werden, ob Antimycin vielleicht an das Herbizidbindeprotein bindet, auch wenn keine Hemmung des Photosystems II durch Antimycin beobachtet werden konnte. DCMU bindet mit hoher Affinität an das Herbizidbindeprotein D1 in Photosystem II. Photosystem II Partikel (100 μ g Chlorophyll/2 ml) wurden mit 0.2 nMolen [14 C]-DCMU inkubiert. Auch bei einer Konzentration von 100 μ M Antimycin konnte keine Verdrängung der gebundenen DCMU Moleküle durch Antimycin in Photosystem II Partikeln beobachtet werden.

Der respiratorische Elektronentransport in Hefemitochondrien wird im Gegensatz zu dem in Rindermitochondrien durch DCMU gehemmt. Als mögliche Bindungsstelle wird die Q_i -Seite im Cytochrom bc_1 Komplex, an der auch Antimycin hemmt, diskutiert. Hefemitochondrien wurden mit 0.046 nMole/2 ml Antimycin (eine Konzentration, bei der Antimycin unter diesen Bedingungen hochspezifisch gebunden wird) vorinkubiert und DCMU in Konzentrationen von 5 μ M bis 500 μ M zugegeben. Antimycin wurde von DCMU nicht verdrängt. Ein Versuch mit umgekehrter Reihenfolge, bei dem mit DCMU vorinkubiert wurde und dann Antimycin zugegeben wurde, bestätigt dieses Resultat. Bei 1 mg/ml Rinder-

serumalbumin im Reaktionsansatz wurden Hefemitochondrien mit 0.1 nMole/2 ml Antimycin vorinkubiert und das Antimycin mit DCMU in Konzentrationen von 5 μ M bis 100 μ M verdrängt. In Abb. 43 ist die Abnahme der gebundenen Antimycinmoleküle gegen die DCMU Konzentration aufgetragen. Bei 100 μ M werden 34 % der gebundenen Antimycinmoleküle durch DCMU verdrängt. Derselbe Versuch wurde mit umgekehrter Reihenfolge der Hemmstoffinkubationen durchgeführt, dabei sind bei 100 μ M noch 40 % der Antimycinmoleküle gegenüber der Kontrolle gebunden. Wie bei den Verdrängungsversuchen mit THBP unterscheiden sich die Resultate der Verdrängungsversuche mit DCMU in Ab- bzw Anwesenheit von Rinder-serumalbumin in Reaktionsansatz grundlegend.

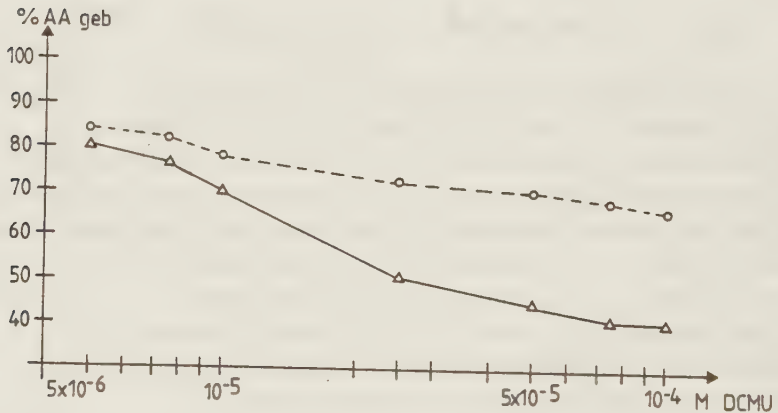


Abb. 43: Verdrängung von [3 H]Antimycin (0.1 nMole/2 ml) durch DCMU (o) und von DCMU durch [3 H]Antimycin (0.1 nMole/2 ml) (Δ) in Hefemitochondrien. Reaktionsbedingungen: 20 mM TRICIN pH 8.0, 20 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml Rinder-serumalbumin, 0.525 mg mitochondriales Protein/2 ml.

3.7. CHARAKTERISIERUNG DER DCMU BINDESTELLE IN HEFEMITOCHONDRIEN:

In den Verdrängungsversuchen konnte nicht geklärt werden, ob DCMU und Antimycin in Hefemitochondrien eine überlappende oder gar dieselbe Bindestelle besetzen. Die DCMU Unempfindlichkeit in Hefemutanten ist in fast allen Fällen auf eine Mutation im Gen für Cytochrom b zurückzuführen (Colson & Slonimski 1979, Briquet & Gouffreau 1981). Ein Teil der DCMU Mutanten weisen eine Kreuzresistenz gegenüber Antimycin auf. Darüber hinaus korreliert bei Hefemutanten, die einen verringerten Cytochrom b Gehalt haben, diese Verminderung mit einer Abnahme der Antimycinbindestelle (Roberts et al 1980). Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Roberts et al stehen die Ergebnisse von Chevilotte et al (1983). In der vorliegenden Arbeit sollte in Analogie zu den Versuchen mit Antimycin die DCMU-Bindestelle durch Bindungsstudien mit radioaktivem DCMU und durch Photoaffinitätsmarkierungen mit Azido-Monuron charakterisiert werden. Neben dem Wildtypstamm Saccharomyces cerevisiae KL 14-4A W* stand der DCMU resistente Stamm KL 14-4A Diu 2-766 zur Verfügung. Die beiden Stämme erhielten wir freundlicherweise von Frau Dr. A. Colson, Louvain-La-Neuve. Die Mutation im Exon I des Gens für Cytochrom b führt in der Mutante KL 14-4A Diu 2-766 zu einem Austausch der Aminosäure 17 Isoleucin zu Phenylalanin. Die Antimycinempfindlichkeit dieser Mutante unterscheidet sich nicht von der des Wildtyps.

3.7.1. I₅₀ BESTIMMUNGEN AN HEFEMITOCHONDRIEN AUS DEM WILD-TYP UND AUS DEM DCMU RESISTENTEN STAMM:

Zur Charakterisierung der Mitochondrien aus den beiden Hefestämmen wurden I₅₀ Werte für Hemmstoffe des Cytochrom bc₁ Komplexes und des Photosystems II bestimmt.

Tabelle 4: I₅₀ Werte für Hemmstoffe des Cytochrom bc₁ Komplexes und des Photosystems II in Hefemitochondrien der Stämme KL 14-4a W+ und KL 14-4A Diu 2-766. Die molaren Konzentrationen geben den I₅₀ Wert an oder die Konzentration, bei der x % Hemmung erzielt wurde. In 2 ml Reaktionsmedium wurden 105 - 210 µg mitochondriales Protein eingesetzt. Die Mitochondrien wurden mit der enzymatischen Methode präpariert. Gemessen wurde der O₂-Verbrauch mit NADH als Elektronendonator. k.H. = keine Hemmung, n.b. = nicht bestimmt.

Hemmstoff	KL 14-4A W+	KL 14-4A Diu 2-766
DCMU	4 µM	50 µM 30%
Antimycin	4.3 nM	6.2 nM
HQNO	0.6 µM	0.2 µM
Myxothiazol	14 nM	12 nM
Atrazin	k.H.	k.H.
Azidothiazol	20 µM	25 µM
Bromanil	10 µM 30%	10 µM 26%
HBPMC	1.2 µM 44%	1 µM 23%
	5 µM 64%	5 µM 48%
	10 µM 73%	10 µM 59%
Ioxynil	12 µM 30 %	n.b.
	50 µM 50%	
Metribuzin	k.H.	k.H.
Phenmedipham	k.H.	k.H.
Terbutryn	k.H.	k.H.

Die DCMU resistente Mutante KL 14-4A Diu 2-766 besitzt keine Kreuzresistenz gegenüber einem der hier getesteten Cytochrom bc₁ Hemmstoffe Antimycin, Myxothiazol und HQNO. Von den Photosystem II Hemmstoffen des DCMU Typs zeigten Atrazin und Terbutryn (Triazin Herbizide), Metribuzin (ein Triazinon

Herbizid) und Phenmedipham (ein Biscarbamat Herbizid) keinerlei Hemmwirkung (Zuordnung der Herbizide nach Trebst 1980). In Spinatthylakoiden konnte Metribuzin DCMU kompetitiv verdrängen (Tischer & Strotmann 1977). In Metribuzin resistenten Mutanten von Chlamydomonas reinhardtii wurden unveränderte Empfindlichkeiten und Bindungskonstanten gegenüber Atrazin und DCMU beobachtet (Pucheu et al 1984). Daraus kann gefolgert werden, daß in Chlamydomonas reinhardtii die Bindestellen für DCMU und Metribuzin nicht vollständig identisch sind. In Analogie dazu zeigen die DCMU empfindlichen Hefemitochondrien keinerlei Empfindlichkeit gegenüber Atrazin, Metribuzin, Terbutryn und Phenmedipham. Ioxynil, ein phenolischer Hemmstoff hemmt den mitochondrialen Elektronentransport in Hefe nur schwach. Eine nennenswerte Hemmwirkung haben HBFMC (4-Hydroxy-3-Brom-2,6-difluoro-methylchinoln = DTK 1798) und Azidothiazol, ein substituiertes Ketonitril.

3.7.2. DCMU BINDUNG AN HEFEMITOCHONDRIEN:

In DCMU-Bindungsstudien sollten die Bindungskonstanten und die Anzahl der Bindestellen für den Wildtyp und die Mutante bestimmt werden. Zunächst wurden DCMU Bindungen an Mitochondrien, die aus gekauften Hefezellen isoliert wurden, durchgeführt. In Abb. 44 sind die Bindungskurven dargestellt. [Methyl- ^{14}C]-DCMU bindet in linearer Abhängigkeit an Hefemitochondrien. Es ist keine Sättigung zu erkennen. Auch in Anwesenheit von 1 mg Rinderserumalbumin/ml kann keine hochaffine Bindung nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde die Bindung von [Methyl- ^{14}C]-DCMU an Spinatthylakoide überprüft (Abb. 44). Sie zeigt den typischen Verlauf: die hochaffine Bindung wird bei höheren DCMU Konzentrationen von unspezifischen Bindungen überlagert.

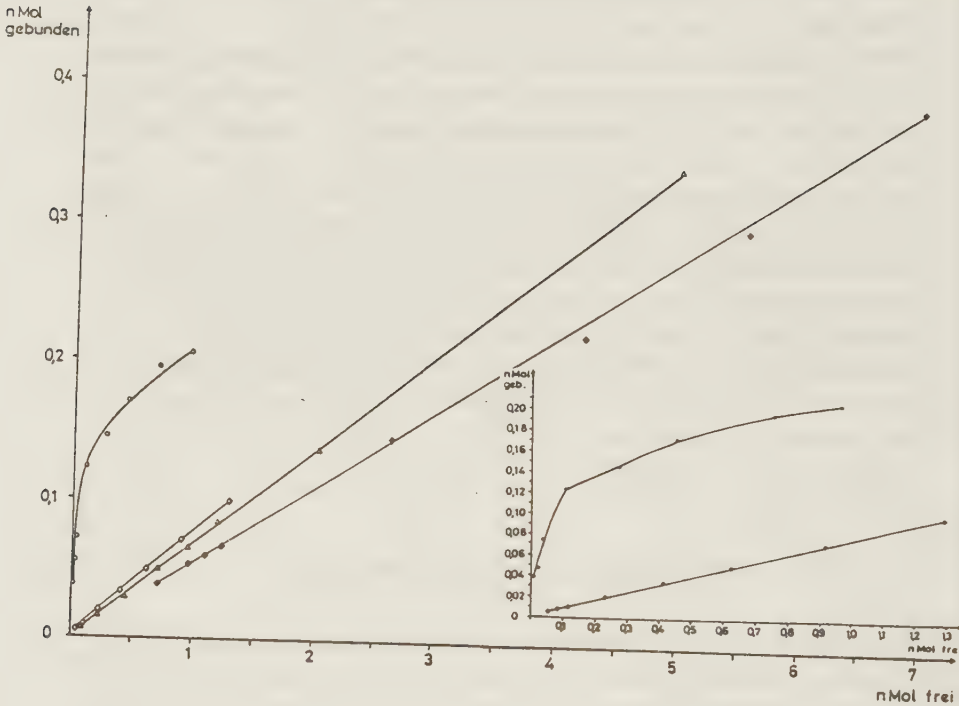


Abb. 44: Bindung von [^{14}C]-DCMU an Hefemitochondrien in Anwesenheit von 1 mg/ml Rinderserumalbumin (◆) und in Abwesenheit von RSA (◇) und (Δ); Reaktionsbedingungen: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.4, 0.5 mg mitochondriales Protein.
Zum Vergleich Bindung von [^{14}C]-DCMU an Spinatthylakoide (○), Reaktionsbedingungen: 0.25 M Saccharose, 50 mM TRIS pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 50 μg Chlorophyll/2 ml.

3.7.3. UMGEHUNG DER DCMU HEMMUNG IN HEFEMITOCHONDRIEN DURCH DCPIPH₂ :

Alexandre & Lehninger beschrieben 1984, daß sich die Antimycinhemmung in Rattenlebermitochondrien durch DCPIP

aufheben läßt. Antimycin blockiert die Reoxidation der Cytochrom b_h Hämgruppe und unterbricht damit den Q-Zyklus. In Anwesenheit von Antimycin reduziert DCPIP H_2 das am Q_o -Zentrum entstandene Semichinon zum Chinol. Cytochrom b ist in diesem System nicht mehr an dem Elektronentransport beteiligt. Myxothiazol blockiert den DCPIP-Elektronentransport, da es am Q_o -Zentrum die Reduktion des Rieske Proteins verhindert. Mit Hilfe dieses 'DCPIP bypass' wurde in dieser Arbeit überprüft, ob DCMU am Q_o -Zentrum hemmt und damit seine Hemmung durch DCPIP nicht aufgehoben werden kann oder sich antimycinähnlich verhält. Der O_2 Verbrauch in Hefemitochondrien wurde durch Antimycin zu 87 % gehemmt und erhöhte sich nach Zugabe von DCPIP wieder auf 100 %. Eine dann erfolgende Zugabe von Myxothiazol hemmte diese Rate zu 73 %. Zum Vergleich wurde der O_2 Verbrauch durch DCMU auf 11 % erniedrigt, erreichte nach Zugabe von DCPIP 90 % der Ausgangsaktivität und wurde durch Hinzufügen von Myxothiazol zu 73 % gehemmt. In dem von Alexandre & Lehninger für Antimycin beschriebenen bypass verhält sich DCMU wie Antimycin und damit wie ein Hemmstoff des Q_i -Zentrums.

3.7.4. STEADY STATE MESSUNGEN AM CYTOCHROM bc_1 KOMPLEX AUS HEFE:

Mit Hilfe von steady state Messungen kann der Wirkort von DCMU im Cytochrom bc_1 Komplex genauer bestimmt werden. Dies erfolgt im Vergleich mit Hemmstoffen, die spezifisch nur das Q_o - oder nur das Q_i -Zentrum hemmen. Von Jagow & Link (1986) teilen die Hemmstoffe des Cytochrom bc_1 Komplexes in drei Gruppen ein, deren Wirkorte in Abb. 45 eingezeichnet sind.

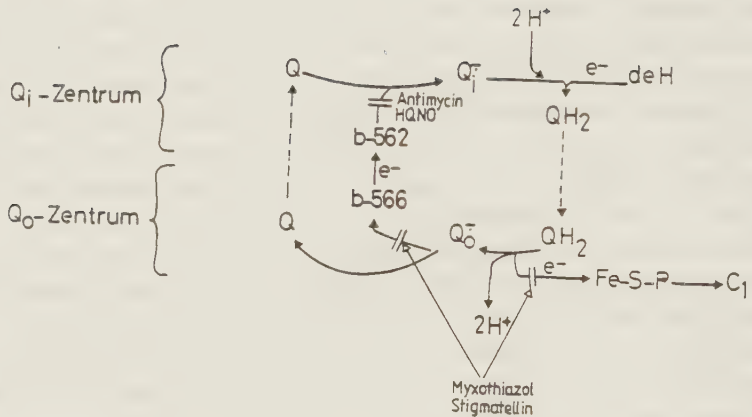


Abb. 45: Schema eines Q-Zyklus im Cytochrom bc_1 Komplex mit Angabe der Wirkorte von Antimycin, HQNO, Stigmatellin und Myxothiazol.

Liegt ein Hemmstoff der Q_i -Seite vor, wird Cytochrom b über die Q_o -Seite reduziert, liegt ein Hemmstoff der Q_o -Seite vor, so erfolgt die Reduktion über die Q_i -Seite. Mit Hilfe von steady state Messungen kann auch das Phänomen der oxidant induced reduction untersucht werden: Wenn kein künstlicher Elektronenakzeptor vorhanden ist, liegen nach Zugabe von Ubichinol 2 Cytochrom c_1 , das Rieske Protein und ein Teil des Cytochrom b in reduzierter Form vor. In Anwesenheit von Antimycin ist die Reoxidation von Cytochrom b am Q_i -Zentrum blockiert. Die dann erfolgende Zugabe von Ferricyanid bewirkt eine Oxidation des Rieske Proteins und des Cytochroms c_1 , Ubichinol kann am Q_o -Zentrum durch das Rieske Protein oxidiert werden, Cytochrom b wird durch das dabei entstandene Semichinon reduziert und kann durch die Blockierung des Q_i -Zentrums durch Antimycin nicht wieder oxidiert werden. In Abb. 46 ist diese Extrareduktion des Cytochrom b im Cytochrom bc_1 Komplex zu sehen. Nach der Zugabe von Ubichinol 2 liegen in Abwesenheit eines Hemmstoffes 32 %

des durch Dithionit reduzierbaren Cytochrom b des Cytochrom bc_1 Komplexes aus Hefe reduziert vor. Wird dann Antimycin und Ferricyanid hinzugefügt, liegen 51 % des durch Dithionit reduzierbaren Cytochroms b in reduzierter Form vor.



Abb. 46: Steady state Messungen am Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe. Reduktion Cyt b bei 562-577 nm gemessen. Versuch zur 'oxidant-induced reduction'. 0.1 mM Ubichinol 2 = UQH₂, 2 μ M Antimycin = AA, 16 μ M Ferricyanid = Fecy

In Anwesenheit von Antimycin und Myxothiazol wurde kein Cytochrom b reduziert, beide Zentren sind blockiert (double kill). Um eine Auskunft darüber zu erhalten, ob DCMU an dem Q_i - oder an dem Q_o -Zentrum wirkt, wurde dessen Einfluß auf die Reduktion von Cytochrom b in Kombination mit anderen Hemmstoffen und im Vergleich mit diesen untersucht. In Anwesenheit von DCMU wurden 53 % des durch Dithionit reduzierbaren Cytochroms b reduziert, d.h. 21 % mehr als in Abwesenheit von DCMU (Abb. 47a). Erfolgte die DCMU Zugabe erst nach der Reduktion von Ubichinol wurde eine Extrareduktion ausgelöst, die mit 51 % denselben Wert erreichte wie die Reduktion durch Ubichinol 2 des mit DCMU vorinkubierten Cytochrom bc_1 Komplexes bzw. des der oxidant unduced reduction mit Antimycin und Ferricyanid. Eine Oxidation des Rieske Proteins und des Cytochroms c_1 durch Ferricyanid führte nicht zu einer weiteren Extrareduktion (Abb. 47 b).

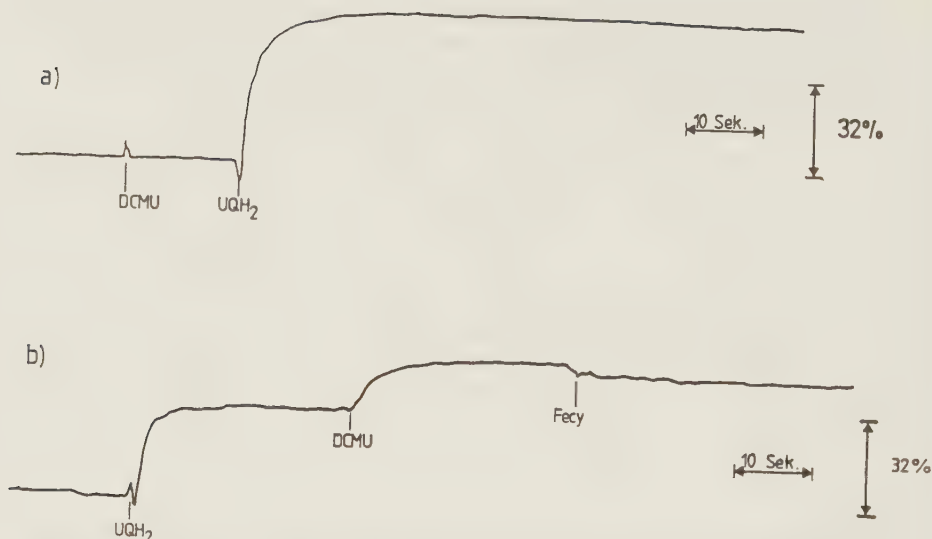


Abb. 47: Steady state Messungen am Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe, Reduktion Cyt b bei 562-577 nm gemessen.

a) 20 μ M DCMU = DCMU, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQH₂

b) 0.1 mM Ubichinol 2 = UQH₂, 20 μ M DCMU = DCMU, 16 μ M Ferricyanid = Fecy.

In Anwesenheit von Myxothiazol, einem Hemmstoff des Qo-Zentrums, und DCMU wurden 55 % des durch Dithionit reduzierbaren Cytochroms b reduziert (Abb. 48). In Anwesenheit von Antimycin und DCMU erfolgte eine 50 %ige Reduktion (Abb. 49). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß DCMU sowohl das Qo- als auch das Qi-Zentrum beeinflusst.

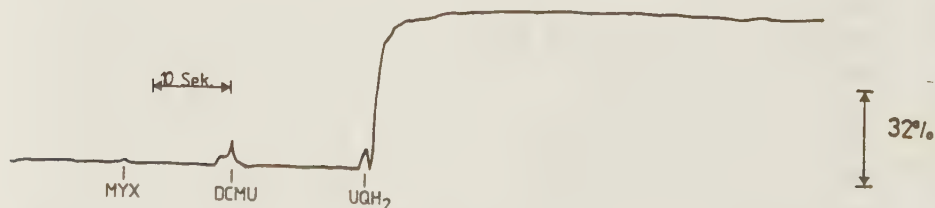


Abb. 48: Steady state Messungen am Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe. Cyt. b Reduktion bei 562-577 nm gemessen. 2 μ M Myxothiazol = Myx, 20 μ M DCMU = DCMU, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQH₂



Abb. 49: Steady state Messungen am Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe. Cyt b Reduktion gemessen bei 562-577 nm, 2 μ M Antimycin = AA, 20 μ M DCMU = DCMU, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQH₂.

3.7.5. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNGEN MIT [¹⁴C]-AZIDO-MONURON UND MIT [¹⁴C]-AZIDO-PLASTOCHINON AN MITOCHONDRIEN UND KOMPLEX III AUS HEFE UND RIND:

3.7.5.1. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNGEN MIT AZIDO-MONURON

Boschetti et al synthetisierten 1985 3-[¹⁴C]-Azido-Monuron, das die Azidogruppe in meta Stellung zur Harnstoffgruppe trägt und das 32 kD Protein (D1-Protein) und das 41 kD Protein in Thylakoiden aus Chlamydomonas reinhardtii markiert. Dieses DCMU Derivat wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Boschetti zur Verfügung gestellt. Da die Stellung der Azidogruppe bei Photoaffinitätsmarkierungen von großer Bedeutung ist, wurden parallel dazu Versuche mit 4-[¹⁴C]-Azido-Monuron von Amersham, bei dem das Cl Atom in para Stellung zur Harnstoffgruppe durch eine Azidogruppe ersetzt ist, durchgeführt. Die beiden DCMU Derivate sind in Abb. 50 dargestellt.

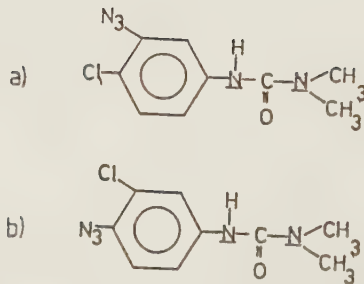


Abb. 50: Strukturformeln der verwendeten Azido-Monurone

a) 3-[^{14}C]-Azido-monuron, Boschetti, Bern

b) 4-[^{14}C]-Azido-Monuron, Amersham

a) Versuche mit Azido-Monuron von Amersham:

Mitochondrien, die aus Uniform Hefe und aus den Hefestämmen KL 14-4A W⁺ und KL 14-4A Diu 2-766 mit der Dynamillmethode präpariert worden waren, wurden mit 0.8 nMolen 4-[^{14}C]-Azido-Monuron (Amersham) pro mg mitochondrialem Protein markiert. Die mitochondrialen Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt, die radioaktiven Banden wurden durch Exposition des getrockneten Gels auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht (Abb. 51). Bei allen Hefestämmen liegt die Bande mit der stärksten Markierung im Bereich von 30 kD. Bei den Mitochondrien aus dem Diuron resistenten Stamm ist außerdem eine starke Markierung im Bereich von 60 kD zu erkennen, die bei den Mitochondrien aus Uniformhefe schwach und bei denen aus dem Wildtypstamm KL 14-4A W⁺ gar nicht ausgeprägt ist. Eine Bande im Bereich von 43 kD ist in den Mitochondrien aus KL 14-4A W⁺ stärker als in denen aus Uniformhefe und aus KL 14-4A Diu 2-766 markiert.

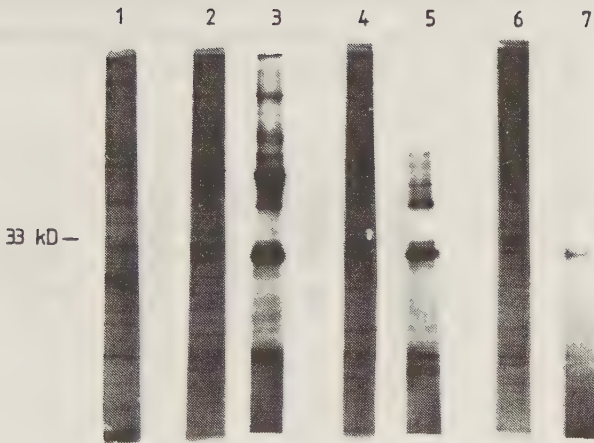


Abb. 51: Photoaffinitätsmarkierung mit 4-[^{14}C]-Azido-Monuron, Amersham (0.8 nMole/mg Protein) von Hefemitochondrien. 11-15% SDS-PAGE, Röntgenfilm 8 Tage exponiert.

1)	Spinatthylakoide als Marker;	
2)	Hefemitochondrien Kl 14-4A Diu 2-766,	Coomassiefärb.
3)		Autoradiographie
4)	Hefemitochondrien Kl 14-4a W ⁺ ,	Coomassiefärb.
5)		Autoradiographie
6)	Hefemitochondrien Uniform,	Coomassiefärb.
7)		Autoradiographie

Da als Wirkort der DCMU Hemmung in Hefemitochondrien das Qo- oder das Qi-Zentrum des Cytochrom bc_1 Komplexes angenommen wird, wurde dieser mit 1 nMol 4-[^{14}C]-Azido-Monuron (Amersham) pro mg Protein markiert. Zum Vergleich wurden Mitochondrien aus Uniform Hefe und aus Kl 14-4A W⁺ mit 2 nMolen 4-[^{14}C]-Azido-Monuron pro mg mitochondrialem Protein versetzt. Die Autoradiographien sind zusammen mit den häm- und coomassiegefärbten Gelen in Abb. 52 abgebildet. Im Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe ist wie in den Mitochondrien aus Uniformhefe und aus Kl 14-4A W⁺ die stärkste Markierung im Bereich von 30 kD zu erkennen. Diese Bande wird auch bei der Cytochromfärbung angefärbt und könnte Cytochrom b sein, das in diesem Gelsystem bei 30 kD

zusammen mit Cytochrom c_1 läuft, das aufgrund seiner kovalent gebundenen Hämgruppe angefärbt wird (Ljungdahl et al 1987). Entgegen den Erwartungen wird aber diese Bande bei 30 kD in Mitochondrien aus der Diuron resistenten Hefe ebenso stark markiert wie in den Wildtypmitochondrien.

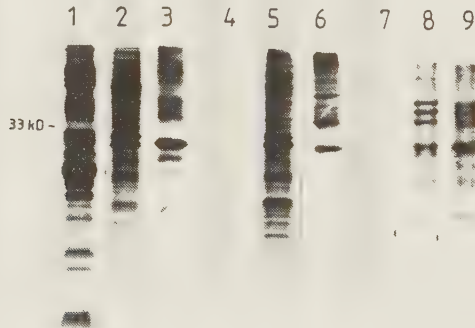


Abb. 52: Photoaffinitätsmarkierung von Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe mit [^{14}C]-Azido-Monuron, Amersham (2 nMol/mg Protein bei Mitochondrien, 1 nMol/mg Protein bei Cyt bc_1 Komplex) 16% SDS-PAGE, vor der Coomassiefärbung wurde eine Hämfärbung durchgeführt.

1) Spinatthylakoide als Marker	
2) Hefemitochondrien Kl 14-4A W+,	Coomassiefärbung
3)	Autoradiographie
4) Hefemitochondrien Uniform,	Hämfärbung
5)	Coomassiefärb.
6)	Autoradiographie
7) Cytochrom bc_1 Uniform	Hämfärbung
8)	Coomassiefärb.
9)	Autoradiographie

Wie schon erwähnt wird der respiratorische Elektronentransport in Rindermitochondrien durch DCMU nicht gehemmt. Um die Spezifität der Monuronmarkierung in Hefemitochondrien zu überprüfen, wurden deshalb Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind mit 4-[^{14}C]-Azido-Monuron markiert (Abb. 53). In Mitochondrien aus Rinderherz ist keine spezifische Markierung zu erkennen, im Cytochrom bc_1 Komplex ist eine

schwache Bande im Bereich der Coreproteine zu erkennen, in beiden Fällen ist kein Protein im Bereich von 30 kD markiert. Dies spricht für die Spezifität der DCMU Markierung in Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe.

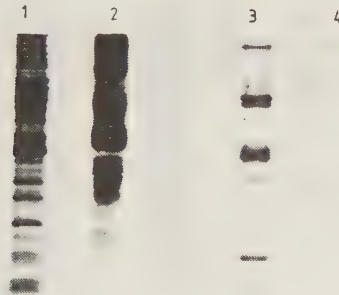


Abb. 53: Photoaffinitätsmarkierung von Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplex aus Rinderherz mit 4- $[^{14}C]$ -Azido-Monuron, Amersham (2 nMol/mg bei Mitochondrien, 1 nMol/mg bei Cyt bc_1 komplex). 16% SDS-PAGE.

- | | |
|--------------------------------------|------------------|
| 1) Rinderherzmitochondrien | Coomassiefärb. |
| 2) | Autoradiographie |
| 3) Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind | Coomassiefärb. |
| 4) | Autoradiographie |

b) Versuche mit Azido-Monuron von Boschetti:

Mitochondrien aus Uniformhefe und den Hefestämmen Kl 14-4A W⁺ und Kl 14-4A Diu 2-766 und Cytochrom bc_1 Komplex aus Uniformhefe wurden mit 3- $[^{14}C]$ -Azido-Monuron (Boschetti) markiert. Wie bei dem Amersham DCMU Derivat ist eine Schwärzung des Röntgenfilms bei 30 kD in allen drei Proben zu erkennen (Abb. 54). Außerdem ist eine Bande im Bereich von 15 kD bei den Mitochondrien, nicht aber im Cytochrom bc_1 Komplex radioaktiv. Auch bei

der Markierung mit 3-[^{14}C]-Azido-Monuron ist die Bande bei 30 kD in den Mitochondrien aus dem Wildtyp nicht stärker markiert als in denen aus der Diuron resistenten Mutante.

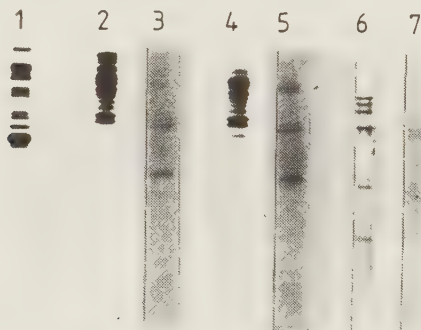


Abb. 54: Photoaffinitätsmarkierung von Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe mit 3-[^{14}C]-Azido-Monuron, Boschetti (2 nMol/mg Protein bei Mitochondrien, 1 nMol/mg Protein bei Cyt. bc_1), 16% SDS-PAGE, Röntgenfilm 5 Wochen exponiert.

- 1) Spinatthylakoide als Marker
- 2) Mitochondrien Kl 14-4A W*
- 3)
- 4) Mitochondrien Kl 14-4A Diu 2-766
- 5)
- 6) Cytochrom bc_1 Komplex Uniferm
- 7)

Coomassiefärb.
Autoradiographie
Coomassiefärb.
Autoradiographie
Coomassiefärb.
Autoradiographie

3.7.5.2. PHOTOAFFINITÄTSMARKIERUNGEN MIT AZIDOPLASTOCHINON:

In Plastochinon verarmten Spinatthylakoiden kann DCMU durch Plastochinon 1 verdrängt werden (Oettmeier et al 1984). In Anlehnung daran müßten, wenn DCMU im Cytochrom bc_1 Komplex an der Q_0 oder der Q_i Seite die Ubichinonbindenische besetzt, die gleichen Proteine durch Azido-Monuron und durch ein Ubichinonderivat markiert werden. Da Plastochinon und Ubichinon eine ähnliche Strukturformel haben, wurden Photoaffinitätsmarkierungen mit einem Azido-Plastochinonderivat (Abb. 55)

durchgeführt.

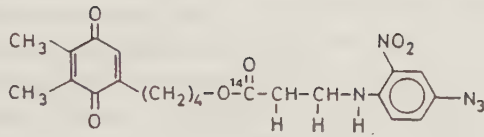


Abb. 55: Strukturformel des verwendeten Plastochinonazids:
2,3-Dimethyl-5-(4'-[3-(4-azido-2-nitro-anilino)-[4'- ^{14}C]-propionyloxy]n-butyl)-1,4-benzochinon (Oettmeier et al 1982)

Hefemitochondrien aus dem Stamm KL14-4A W⁺ und Rinderherz-mitochondrien wurden mit 1 nMol [^{14}C]-Azido-Plastochinon markiert (Abb.56).

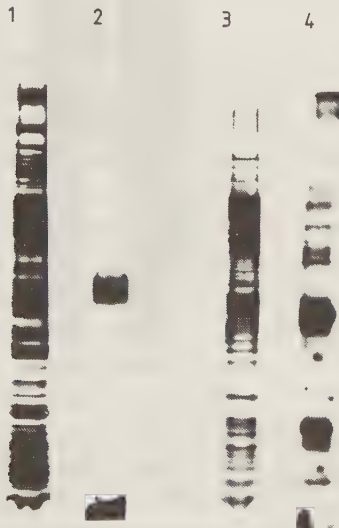


Abb. 56: Photoaffinitätsmarkierung von Rinderherzmitochondrien und von Hefemitochondrien KL 14-4A W⁺ mit [^{14}C]Azido-Plastochinon (1 nMol/mg Protein). 11-15% SDS-PAGE.

- | | |
|--|------------------|
| 1) Rinderherzmitochondrien | Coomassiefärbung |
| 2) | Autoradiographie |
| 3) Hefemitochondrien KL 14-4A W ⁺ | Coomassiefärbung |
| 4) | Autoradiographie |

In Hefemitoochondrien ist eine starke Bande im Bereich von 30 kD zu erkennen und eine schwache Bande im Bereich von 15 kD. In Rinderherzmitochondrien ist eine Bande im Bereich von 37 kD zu erkennen, die aber deutlich schwächer ist als die in Hefemitoochondrien bei 30 kD liegende. Um zu überprüfen, ob die Bande bei 30 kD, die in Hefemitoochondrien durch das Plastochinonderivat markiert wurde dieselbe ist, wie die bei der Markierung mit Azidomonuron, wurden beide Proben in einem SDS-PAGE in benachbarten Spuren aufgetragen. Wie in Abb. 57 zu sehen, liegen die radioaktiv markierten Peptide auf einer Höhe.



Abb. 57: Vergleich der markierten Polypeptiduntereinheiten in Hefemitoochondrien nach Photoaffinitätsmarkierung mit 4- $[^{14}\text{C}]$ -Azido-Monuron und $[^{14}\text{C}]$ -Azidoplastochinon (PQ). 11-15 % SDS-PAGE.

1)	Hefemitoochondrien KL 14-4A W ⁺ PQ Mark.	Coomassiefärb.
2)		Autoradiographie
3)	Hefemitoochondrien KL 14-4A W ⁺ DCMU Mar.	Coomassiefärb.
4)		Autoradiographie

3.7.6. IDENTIFIZIERUNG DES 30 KD PROTEINS DURCH SEQUENZANALYSE:

Durch die Sequenzierung des markierten 30 kD Proteins sollte geklärt werden, ob es sich tatsächlich um Cytochrom b handelt. Dafür wurde Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe in einem 16 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Bande bei 30 kD ausgeschnitten und das Protein elektroeluiert. Im Edman Abbau, der von Herrn Dr. H. Meyer, Bochum durchgeführt wurde, konnte die Sequenz leider nicht gelesen werden. Wahrscheinlich war Cytochrom b N-terminal blockiert.

3.7.7. IDENTIFIZIERUNG DES MARKIERTEN 30 KD PEPTIDS MIT WESTERN BLOTS:

Mit Hilfe von Antikörpern gegen Cytochrom b sollte geklärt werden, ob es sich bei dem 30 kD Peptid, das durch Azido-Monuron und einem Azido-Plastochinonderivat in Mitochondrien und Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe markiert wurde, um Cytochrom b handelt. Aufgrund von Sequenzvergleichen geht man davon aus, daß in Chloroplasten die 17 kD Untereinheit zusammen mit Cytochrom b mit 23 kD dem 40 kD Cytochrom b in Mitochondrien entsprechen. Freundlicherweise stellte Michael Schimiczek, Bochum die gegen die Untereinheit 17 kD und gegen Cytochrom b aus Spinat hergestellten Antikörper zur Verfügung. Hefemitochondrien, Rindermitochondrien, Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind und Spinatthylakoide wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Nitrocellulose wurde in zwei Hälften geteilt; mit der einen Hälfte wurde die Reaktion mit dem Antikörper gegen Cytochrom b und mit der anderen die mit der 17 kD Untereinheit durchgeführt (Abb. 58). Bei Hefemitochondrien konnte mit beiden Antikörpern keine spezifische Reaktion beobachtet werden. In Rindermitochondrien reagierten beide Antikörper mit einem Protein, das fast auf gleicher Höhe lief. Allerdings reagierte der Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind nicht mit dem Antikörper gegen die 17 kD Untereinheit, zwei Proteinbanden reagierten mit dem Antikörper

gegen Cytochrom b, die eine lag etwas über derjenigen, die bei Rinderherzmitochondrien eine Reaktion mit anti Cytochrom b einging, die andere auf der Höhe von ungefähr 25 kD.

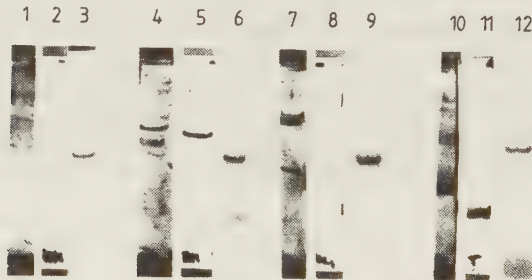


Abb. 58: Western Blot von Hefe- und Rindmitochondrien, Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind und Spinatthylakoiden mit Antikörpern gegen Cytochrom b und die 17 kD Untereinheit des Cytochrom b₆f Komplex aus Spinat. 15 % SDS-PAGE, Minigel.

1) Hefemitochondrien Uniform	Cyt b (325-3)
2)	17 kD (327-t)
3)	Hämfärbung
4) Rinderherzmitochondrien	Cyt b (325-3)
5)	17 kD (327-t)
6)	Hämfärbung
7) Cytochrom bc ₁ aus Rind	Cyt b (325-3)
8)	17 kD (327-t)
9)	Hämfärbung
10) Spinatthylakoide	Cyt b (325-3)
11)	17 kD (327-t)
12)	Hämfärbung

Mit einem Antikörper gegen Cytochrom b von Paracoccus denitrificans den wir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Trumpower, Hanover USA erhalten haben, wurde überprüft, ob der Antikörper gegen die 17 kD Untereinheit mit Cytochrom b aus Rind reagiert (Abb. 59). Die Proteinbande, die mit Antikörper gegen Cytochrom b aus Paracoccus denitrificans reagiert, liegt deutlich unterhalb von der, die mit dem Antikörper gegen die 17 kD Untereinheit aus Spinat reagiert. Eine Proteinbande in Hefemitochondrien reagierte mit dem Antikörper gegen Cytochrom

b aus *Paracoccus*, lag aber mit einem Molekulargewicht unter 17 kD mit Sicherheit nicht in dem Bereich von Cytochrom b und war auch nicht reproduzierbar. Mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern konnte leider nicht geklärt werden, ob es sich bei dem durch Azido-Monuron und einem Plastochinonderivat markierten 30 kD Protein in Hefe um Cytochrom b handelt.



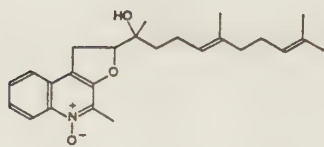
Abb. 59: Western Blot von Cytochrom *b_L* f Komplex aus Spinat, Cytochrom *bc_L* Komplex aus Rind, Rindmitochondrien, Hefemitochondrien und Spinatthylakoiden mit Antikörpern gegen Cytochrom b aus *Paracoccus denitrificans* und gegen die 17 kD Untereinheit aus Spinat. 15% SDS-PAGE, Minigel.

1) Cytochrom <i>b_L</i> f Komplex aus Spinat	Cyt b Paracoc.d.
2) Cytochrom <i>bc_L</i> Komplex aus Rind	Cyt b Paracoc.d.
3) Rinderherzmitochondrien	Cyt b Paracoc.d.
4) Hefemitochondrien	Cyt b Paracoc.d.
5) Spinatthylakoide	Cyt b Paracoc.d.
6) Hefemitochondrien	17 kD (327-t)
7) Rinderherzmitochondrien	17 kD (327-t)
8) Cytochrom <i>bc_L</i> Komplex aus Rind	17 kD (327-t)
9) Spinatthylakoide	17 kD (327-t)

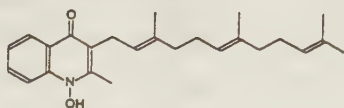
3.8. HEMMUNG DER OXIDOREDUKTASEAKTIVITÄTEN DURCH AURACHINE:

Aurachine sind Antibiotika, die aus dem Myxobakterium *Stigmatella aurantica* isoliert werden und die NADH Oxidation in submitochondrialen Partikeln von Rind hemmen (Kunze et al 1987). An welchem Proteinkomplex der respiratorischen Elektronentransportkette die Aurachine wirken, ist bislang

unbekannt. Die Strukturformeln der Aurachine A,B,C und D sind in Abb. 60 dargestellt. Die strukturelle Ähnlichkeit mit 2-Heptyl-4-Hydroxychinolin-N-Oxid (HQNO) und HBFMC lassen vermuten, daß die Aurachine wie HQNO die Cytochrom bc Komplexe hemmen.



Aurachin A



Aurachin C

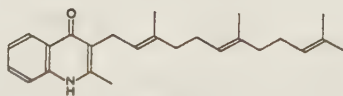
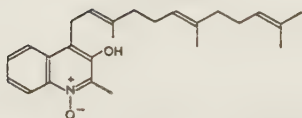


Abb. 60: Strukturformeln der Aurachine A,B,C,D; entnommen aus Kunze et al (1987).

Die Hemmung der Oxidoreduktaseaktivitäten im Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind und im Cytochrom b_6f Komplex aus Spinat durch die Aurachine A,B,C,D ist zusammen mit der Hemmung durch Stigmatelin in Tab.5 aufgeführt.

Tabelle 5: Hemmung der Ubichinol-Cytochrom c-oxidoreduktase aus Rind und der Plastochinol-Plastocyanin-oxidoreduktase aus Spinat durch die Aurachine A,B,C und D (I_{50} Werte). Reaktionsbedingungen wie unter 2.17 beschrieben.

	Aura. A	Aura. B	Aura. C	Aura.D	Stigmatel.
bc_1 Rind	60 μ M	32 μ M	50 nM	8 nM	70nM
b_6f Spinat	40 μ M	18 μ M	100 nM	32 nM	70nM

Die Aurachine A und B hemmen zwar beide die Oxidoreduktaseaktivität, sind aber im Vergleich zu den Aurachinen C und D um ungefähr 3 Zehnerpotenzen schlechtere Hemmstoffe. In submito-

chondrialen Partikeln aus Rind hemmen alle 4 Aurachine 50 % der NADH Oxidation im Bereich von 38 bis 71 nM (Kunze et al 1987). Daraus folgt, daß die Aurachine A und B noch einen der anderen Proteinkomplexe in der respiratorischen Elektronentransportkette als Wirkungsort haben müssen. Mit einem pI_{50} Wert von 7.3 für den Cytochrom bc_1 Komplex und einem von 7.0 für den Cytochrom b_6f Komplex stellt Aurachin C einen ausgezeichneten Hemmstoff dar. Aurachin D mit einem pI_{50} Wert von 8.1 übertrifft sogar Stigmatellin, das bisher als der beste Cytochrom b_6f Komplex Hemmstoff galt (Oettmeier et al 1985). Auch im Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind hat Aurachin D mit 7.5 den größten pI_{50} Wert der getesteten Aurachine.

3.9. STEADY STATE MESSUNGEN AM CYTOCHROM bc_1 KOMPLEX AUS RIND:

Die Oxidoreduktaseaktivität der Cytochrom bc Komplexe aus Rind und Spinat wird durch die Aurachine C und D mit pI_{50} Werten von 7 - 8 gehemmt. Steady state Messungen können darüber Auskunft geben, an welcher der bekannten Hemmstoffstellen im Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind die Aurachine C und D wirken. Die Wirkung der Aurachine C und D wurde mit der von bereits charakterisierten Hemmstoffen verglichen. Aus dem Einfluss der Aurachine in Kombination mit Qo - und Qi -Hemmstoffen auf die Cytochrom b Reduktion kann geschlossen werden, ob die Aurachine C und D an das Qo - oder an das Qi -Zentrum binden. In Abb. 61 a/b ist die Reduktion von Cytochrom b durch Ubichinol 2 im Vergleich zur Reduktion durch Dithionit, mit dem das gesamt vorhandene Cytochrom b nicht katalytisch reduziert wird, in Abwesenheit eines Hemmstoffs dargestellt. 38.5 % des durch Dithionit reduzierbaren Cytochrom b wird mit Ubichinol 2 als Elektronendonator reduziert.

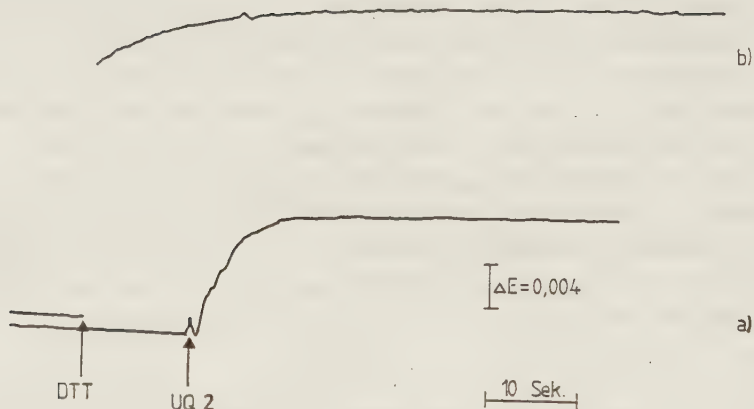


Abb. 61: Steady state Messungen am Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind. Reduktion von Cyt b bei 562-577 nm gemessen. 1.5 nMole Cytb-häm/ml.

a) 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ

b) Na-Dithionit = DTT

In Abb. 62 a wurde vor der Zugabe von Ubichinol 2 Myxothiazol, in Abb. 62 b wurde Antimycin vorgelegt. Es wird genausoviel Cytochrom b reduziert wie in Abwesenheit eines Hemmstoffes. In Anwesenheit von Myxothiazol, das am Q_o -Zentrum angreift, wird Cytochrom b über die Q_i -Seite reduziert, in Anwesenheit von Antimycin über die Q_o -Seite. Antimycin und Myxothiazol zusammen blockieren normalerweise die Cytochrom b Reduktion vollständig (double kill). In Abb. 62c ist dieser Versuch dargestellt, die Reduktion des Cytochroms b wird zu einem erheblichen Teil, jedoch nicht vollständig gehemmt. Dies kann auf einem leakage der Q_o -Seite beruhen, wie sie auch von Trumpower, Hanover (mündliche Mitteilung) beobachtet wurde oder Myxothiazol liegt mit 2 μ M in einer zu geringen Konzentration vor.

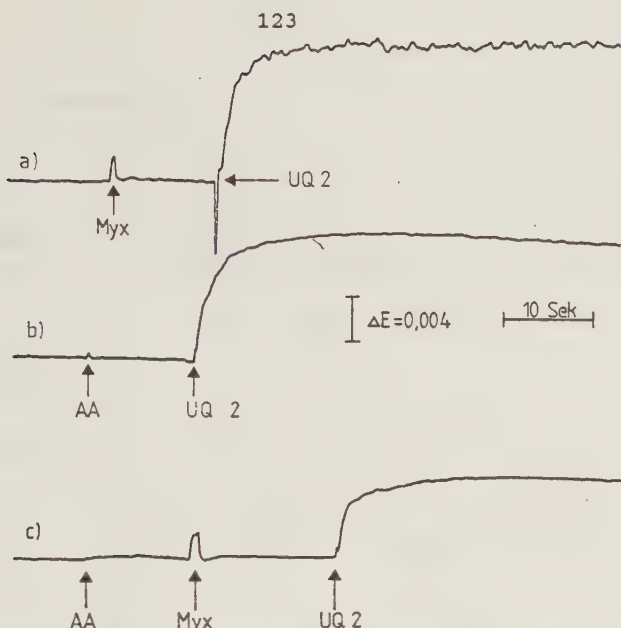


Abb. 62: Steady state Messungen am Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind. Cyt b Reduktion bei 562-577 nm gemessen. 1.5 nMole Cyt b-Häm/ml.

a) 2 μ M Myxothiazol = Myx, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ 2

b) 2 μ M Antimycin = AA, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ 2

c) 2 μ M AA, 2 μ M Myx, 0.1 mM UQ 2

In Abb. 63 a und 63 b wurde die Reduktion von Cytochrom b in Anwesenheit von Aurachin C in Kombination mit Myxothiazol, beziehungsweise mit Antimycin gemessen. Bei Myxothiazol und Aurachin C im Reaktionsmedium wird Cytochrom b in demselben Ausmaß reduziert wie in Anwesenheit von Myxothiazol alleine. Daraus folgt, daß Aurachin C wie Myxothiazol das Qo-Zentrum hemmt. Dies bestätigt auch Abb. 63 b, Antimycin und Aurachin C führen zu einer ganz schwachen Cytochrom b Reduktion, wie sie bei der Kombination Antimycin und Myxothiazol beobachtet wurde (double kill). Aurachin D verhindert, wie Aurachin C, zusammen mit Antimycin fast vollständig die Reduktion von Cytochrom b (Abb. 63 c).

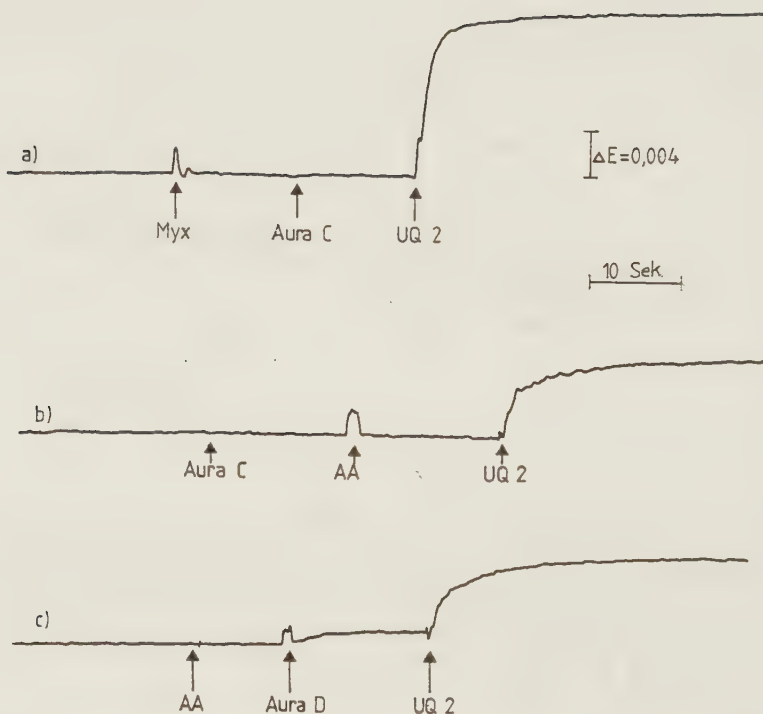


Abb. 63: Steady state Messungen am Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind. Cyt b Reduktion bei 562-577 nm gemessen. 1.5 nMole Cyt b-Häm/ml.

- a) 2 μ M Myxothiazol = Myx, 2 μ M Aurachin C = Aura C, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ 2
- b) 2 μ M Aurachin C = Aura C, 2 μ M Antimycin = AA, 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ 2
- c) 2 μ M AA, 2 μ M Aurachin D = Aura D, 0.1 mM UQ 2

In Abb. 64 a ist die 'oxidant induced reduction' von Cytochrom b wiedergegeben. Durch die Extrareduktion werden insgesamt 66 % des durch Dithionit reduzierbaren Cytochrom b reduziert. In Abb. 64 b und c wurden Aurachin D und C anstelle von Antimycin verwendet. Man erhält keine Extrareduktion von Cytochrom b, die Aurachine C und D haben damit eine wichtige Eigenschaft von Antimycin nicht.

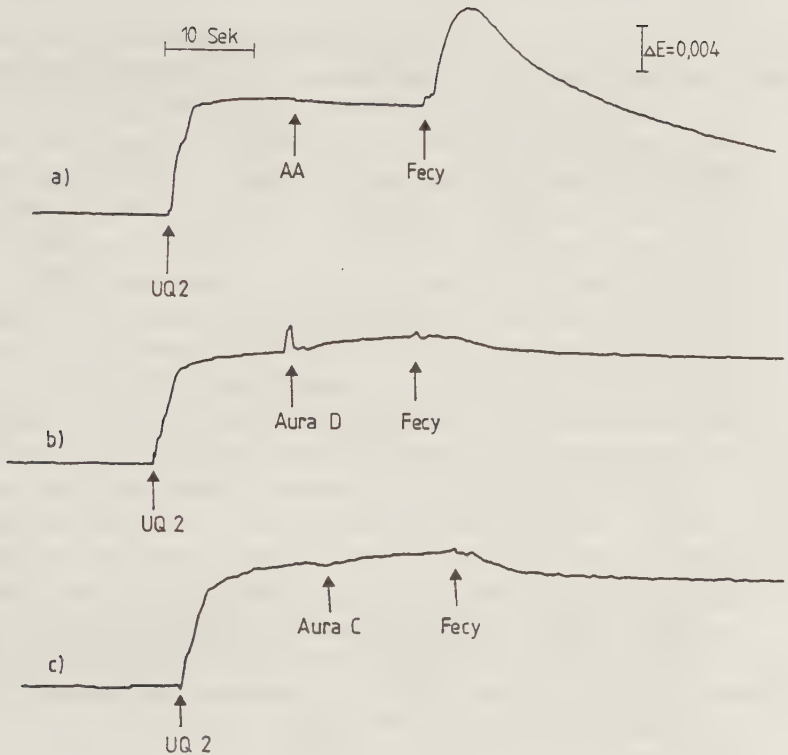


Abb. 64: Steady state Untersuchungen am Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind. Reduktion von Cyt b bei 562-577 nm gemessen, 1.5 nMole Cyt b-Häm/ml. Versuche zur 'oxidant-induced-reduction'

a) 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ 2, 2 μ M Antimycin = AA, 16 μ M Ferricyanid = Fecy.

b) 0.1 mM UQ 2, 2 μ M Aurachin D = Aura D, 16 μ M Fecy

c) 0.1 mM UQ 2, 2 μ M Aurachin C = Aura C, 16 μ M Fecy

In Abb 65 a wurde mit Ubichinol reduziert, Antimycin und Myxothiazol wurden hinzugefügt, das dann zugegebene Ferricyanid kann keine 'oxidant induced reduction' des Cytochroms b bewirken, da die Reduktion durch das Q_o -Zentrum durch Myxothiazol blockiert ist. Im Vergleich dazu ist in Abb. 65 b

Myxothiazol durch Aurachin C ersetzt worden.

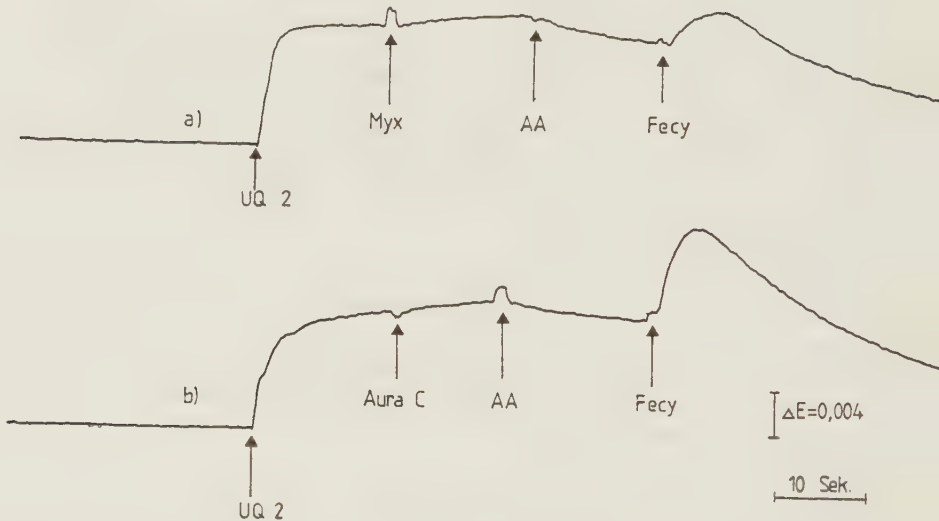


Abb. 65: Steady state Messungen am Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind. Cyt b Reduktion bei 562-577 nm gemessen, 1.5 nMole Cyt b-Häm/ml, Versuche zur 'oxidant-induced-reduction'

a) 0.1 mM Ubichinol 2 = UQ 2, 2 μ M Myxothiazol = Myx, 2 μ M Antimycin = AA, 16 μ M Ferricyanid = Fecy

b) 0.1 mM UQ 2, 2 μ M Aurachin C = Aura C, 2 μ M AA, 16 μ M Fecy

Obwohl aus den bisherigen Versuchsergebnissen geschlossen werden mußte, daß Aurachin C myxothiazolartig hemmt, kann es nicht die 'oxidant induced reduction' von Cytochrom b verhindern und hat damit eine wichtige Eigenschaft von Myxothiazol nicht. Aurachin C und D zusammen verhindern nicht die Reduktion von Cytochrom b durch Ubichinol 2. Aurachin D verhindert wie Aurachin C zusammen mit Antimycin fast vollständig die Reduktion von Cytochrom b und blockiert damit das Q_o -Zentrum (Abb. 63 c). Aus all den Ergebnissen kann geschlossen, daß sich die Aurachine C und D bis auf eine Eigenschaft wie Myxothiazol verhalten. Aurachin C unterscheidet sich von Myxothiazol darin, daß es die 'oxidant induced reduction' von Cytochrom b nicht verhindern kann.

4. DISKUSSION

Zur Ermittlung der Funktion und Struktur der Cytochrom bc Komplexe stellen Hemmstoffe einen wichtigen Zugang dar. So wird der Q-Zyklus, der zwei Chinonbindestellen fordert, durch Experimente unterstützt, die zeigen, daß die Cytochrom b Reduktion nur bei gleichzeitiger Anwesenheit eines Hemmstoffs der chinonoxidierenden Seite = Qo-Seite und eines Hemmstoffes der chinonreduzierenden Seite = Qi-Seite verhindert wird (Rieske 1986, von Jagow & Link 1986, Mitchell & Moyle 1985). Cytochrom b mit seinen zwei unterschiedlichen Hämgruppen ist sowohl an der Bildung der Qi- als auch an der Bildung der Qo-Seite beteiligt. Nach dem Modell von Widger et al (1985) ist die Hämgruppe b₁ mit dem elektronegativen Redoxpotential der cytosolischen, die Hämgruppe b₂ mit dem elektropositivem Redoxpotential der Matrixseite zugewandt; die zwei Chinonbindestellen, Qo und Qi, die sowohl im Q-Zyklus als auch in Semi-chinonzyklus gefordert werden, erhalten durch diese Anordnung der Hämgruppen in der Membran eine strukturelle Grundlage. Sowohl an der Qo- und als auch an der Qi-Seite treten nach diesen Modellen Semichinone als Intermediate auf. Zwei unterschiedliche Semichinonsignale konnten Ohnishi & Trumpower (1980) in ESR Studien nachweisen. Das eine Signal wurde durch Antimycin verstärkt, das andere verschwand in Anwesenheit von Antimycin.

Teilsequenzen des Elektronenflusses im Cytochrom bc₁ Komplex können durch spezifische Hemmstoffe blockiert werden. Die Interaktion des Hemmstoffs an der Bindestelle im Protein führt zur Änderung von Eigenschaften der jeweiligen Redoxkomponenten des Cytochrom bc Komplexes. Durch diese Art der Veränderungen lassen sich jene Redoxkomponenten identifizieren, die an der durch den Hemmstoff blockierten Reaktion beteiligt sind. Antimycin und HQNO blockieren beide im Cytochrom bc₁ Komplex die Reoxidation von Cytochrom b an der Qi-Seite. Durch die Bindung von Antimycin verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Cytochrom b₂ Hämgruppe von 562 nm nach 564 nm. Dieses Phänomen wird als 'red shift' bezeichnet und kann in allen

mitochondrialen, nicht aber im photosynthetischen Cytochrom bc Komplex beobachtet werden (Slater 1973, Hauska et al 1983). HQNO führt zwar im mitochondrialen Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind nicht zu einem 'red shift', im Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe kann jedoch ein 'red shift' durch HQNO induziert werden (Briquet & Gouffeau 1981, Brandon et al 1972).

Die Verwendung von Hemmstoffen bietet also die Möglichkeit, Unterschiede zwischen den Cytochrom bc Komplexen zu charakterisieren und Modelle zur Struktur und Funktion der Cytochrom bc Komplexe zu überprüfen.

Mit Hilfe von Antimycinbindestudien wurde in der vorliegenden Arbeit die chinonreduzierende Seite im photosynthetischen Cytochrom b₆f Komplex mit der im mitochondrialen Cytochrom bc₁ Komplex verglichen werden. Darüberhinaus wurde die chinonreduzierende Seite der mitochondrialen Cytochrom bc₁ Komplexe mit Hilfe von DCMU charakterisiert werden, das nur in Hefe-, nicht aber Rindmitochondrien wirkt. Für diese vergleichenden Studien der chinonreduzierenden Seite wurden Mitochondrien aus Rind und Hefe und Spinatthylakoide isoliert und daraus Cytochrom bc Komplexe präpariert. Die Ergebnisse der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der isolierten Organellen und Cytochrom bc Komplexe sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Tabelle 6: Vergleich der Eigenschaften der isolierten Spinatthylakoide, der Mitochondrien aus Rind und Hefe und den daraus isolierten Cytochrom bc Komplexen. Abkürzungen: DTBH = 2,5-di-tert-butyl-hydrochinon (Elektronendonator für Cyt. b₆f Komplex), PC = Plastocyanin, Chl = Chlorophyll, die Aktivitäten der Cytochrom bc Komplexe sind in $\mu\text{Mole Cytochrom c reduziert/nMol Cytochrom b-Häm x Stunde}$ angegeben. Die Konzentrationen der Hemmstoffe geben die Werte wieder, bei denen 50 % der Aktivität gehemmt wurden (=I₅₀ Wert).

S P I N A T		R I N D		H E F E	
Thylakoide		Mitochondrien		Mitochondrien	
Reaktion	Ferredoxin zykl.	NADH	O ₂	NADH	O ₂
Meßparameter	ATP	O ₂		O ₂	
Aktivität	0.4 $\mu\text{Mole ATP/}$ 100 $\mu\text{g Chl x 3 Min.}$	15 $\mu\text{Mole O}_2/$ mg Prot x Std		3.5-9 $\mu\text{Mole O}_2/$ mg Prot x Std	
Antimycin-Hemmbarkeit	0.14 μM	61 nM		5 nM	
Cytochrom b ₆ f		Cytochrom bc ₁		Cytochrom bc ₁	
Unter-einheiten	4	11		10	
Reaktion	DTBH- PC- Cyt c	UQH ₂ - Cyt c		UQH ₂ - Cyt c	
Aktivität	2.75	755		465	
Antimycin-Hemmbarkeit	keine	16 nM		6 nM	
DCMU-Hemmbarkeit	keine	keine		19 μM	

Die gemessenen Aktivitäten und Reinheitsgrade entsprechen den in der Literatur angegebenen Werten (Aktivität des Ferredoxin zyklischen Elektronentransports siehe Hartung 1985, Cytochrom bc₁ Komplex aus Rindermitchondrien siehe Engel 1983, Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe siehe Ljungdahl et al 1986). Im isolierten

Cytochrom b_6f Komplex führte Antimycin nur bei sehr hohen Konzentrationen zu einer geringen Hemmung der Plastocyanin-reduktion, dies bestätigt die Resultate von Hurt & Hauska, 1981 und Willms et al, 1988. Im Gegensatz dazu war die Cytochrom c Reduktion in den Cytochrom bc_1 Komplexen aus Rind und Hefe mit I_{50} Werten im nM Bereich äußerst antimycinempfindlich. Tripathy & Rieske (1985) konnten zeigen, daß der mitochondriale Cytochrom bc_1 Komplex antimycinunempfindlich wird, wenn man als Elektronenakzeptor nicht Cytochrom c , sondern Plastocyanin einsetzt. Mit Plastocyanin besaß der Cytochrom bc_1 Komplex nur noch die Aktivität, die der Cytochrom b_6f Komplex aufweist. In Anwesenheit von Plastocyanin war jedoch die Antimycinbindung im Cytochrom bc_1 Komplex unverändert.

Die unterschiedliche Antimycinempfindlichkeit des Cytochrom b_6f und des Cytochrom bc_1 Komplexes fand sich auch in dieser Arbeit im linearen Elektronentransport wieder: in Mitochondrien aus Rind wurde dieser mit einer Stöchiometrie von 1 Mol Antimycin/ 0.5 Mol Cytochrom b -Häm vollständig gehemmt, dagegen war der lineare Elektronentransport in Spinatthylakoiden antimycinunempfindlich. Die Antimycinempfindlichkeit der Spinatthylakoide konnte im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport nachgewiesen werden. In Abb. 66 ist der Ferredoxin abhängige, zyklische Elektronentransport schematisch dargestellt.

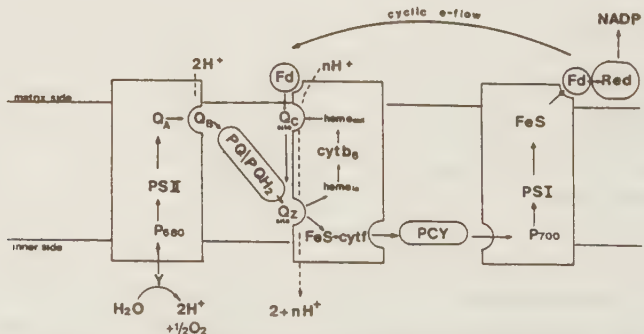


Abb. 66: Darstellung des photosynthetischen Elektronentransports in der Thylakoidmembran, nach Trebst (1986).

In diesem Schema sind die Prozesse im linearen, photosynthetischen Elektronentransport zu erkennen, bei denen Protonen in das Thylakoidlumen freigesetzt werden: bei der Wasserspaltung und bei der Chinoloxidation am Cytochrom b_6f Komplex. Die freigesetzten Protonen werden zur Synthese von ATP verwendet. Die Stöchiometrie von Protonen zu Elektron wird im linearen Elektronentransport durch die Menge von gebildeten ATP Moleküle und der Elektronentransportrate bestimmt. Dabei geht man davon aus, daß bei der Bildung eines ATP 3 Protonen verbraucht werden (Davenport & McCarty 1984).

Bei solchen Untersuchungen stellten Hartung & Trebst (1985) eine Senkung der Stöchiometrie von Protonen zu Elektron durch Antimycin fest. Sie schlugen vor, daß der Cytochrom b_6f Komplex im linearen Elektronentransport Plastochinol auch ohne Beteiligung der Q_i -Seite oxidieren kann. Das würde bedeuten, daß die Cytochrom b_L Hämgruppe (siehe *) das Elektron unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. in Anwesenheit von Antimycin, nicht auf die Hämgruppe b_H der anderen Membranseite überträgt und damit kein elektrogener Schritt stattfindet. Unter einem elektrogenen Schritt versteht man eine transmembrane Reaktion, die zum Aufbau eines Membranpotentials führt. Nach dem Modell von Hartung & Trebst wird an der Q_o -Seite die Cytochrom b_L Hämgruppe durch Plastosemichinon reduziert, das nächste an der Q_o -Seite entstandene Plastosemichinon kann aber an der Q_o -Seite durch diese b_L -Hämgruppe in einer Dismutation zu Plastochinol reduziert werden. Dadurch wird die antimycinempfindliche Q_i -Seite im linearen Elektronentransport umgangen und infolgedessen die Protonen zu Elektronenstöchiometrie gesenkt. Im Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport dagegen soll die Beteiligung der Q_i -Seite ihrer Meinung nach obligatorisch sein. Ihre Versuche sprechen für eine Bindung von Antimycin an die Q_i -Seite des Cytochrom b_6f Komplex.

* Auch wenn sich die Redoxpotentiale der beiden Hämgruppen des Cytochrom b im Cytochrom b_6f Komplex im Gegensatz zu denen des mitochondrialen Cytochrom b nur geringfügig unterscheiden (Cramer et al 1987), sollen hier in Analogie dazu die Hämgruppen mit b_L und b_H bezeichnet werden.

Rich bestreitet dagegen, daß der Cytochrom b_6f Komplex im linearen Elektronentransport Plastocyanin ohne Beteiligung der Q_i -Seite reduzieren kann, da er bei jedem turnover des Cytochrom b_6f Komplexes einen elektrogenen Schritt messen konnte (1988). Er hält eine Hemmung der Q_i -Seite durch Antimycin im Cytochrom b_6f Komplex auch deswegen für unwahrscheinlich, da die Redoxkinetiken von Cytochrom b in diesem Komplex, im Gegensatz zu den mitochondrialen Cytochrom bc_1 Komplexen, nicht durch Antimycin beeinflußt werden. Rich (1984, 1988) und Moos & Bendall (1984) fordern eine Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase, die durch Antimycin gehemmt wird und am Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport beteiligt ist. Diese Ferredoxin-Plastochinon-Reduktase konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von Antimycin an Spinatthylakoiden und Mitochondrien und an den daraus isolierten Cytochrom bc Komplexen untersucht werden. Eine gleichartige Antimycin-Bindungskinetik in Spinatthylakoiden und Mitochondrien könnte ein Hinweis auf eine ähnliche Bindestelle sein. Zur Untersuchung der Antimycinbindung haben sich mehrere Arbeitsgruppen die fluoreszierende Eigenschaft von Antimycin zunutze gemacht (Berden & Slater 1970/1972, Mills et al 1978, Keulen & Berden 1985). Die Bestimmung der Antimycinbindung mit fluorimetrische Methode hat jedoch Nachteile:

- 1) Sie kann nur in Anwesenheit von Rinderserumalbumin erfolgen, deren Effekte gerade im Hinblick auf andere Hemmstoffe, deren Verdrängung durch Antimycin auch untersucht werden soll, unbekannt sind.
- 2) Es können nur die ungebundenen Antimycinmoleküle bestimmt werden. Die gleichzeitige Bestimmung von gebundenen und ungebundenen Molekülen erlaubt aber eine genauere Bestimmung der Bindungskinetiken.

Die Synthese von radioaktivem Antimycin oder einem wirksamen Antimycinanalogon mit einer hohen spezifischen Aktivität würde eine genaue Untersuchung der Bindung von Antimycin ermöglichen. In Verdrängungsexperimenten könnte die Verdrängung des radioaktiven Antimycins durch andere Hemmstoffe untersucht und damit

Auskunft erhalten werden, ob diese Hemmstoffe die gleiche oder eine andere Bindestelle wie Antimycin besetzen. Außerdem könnte in ein radioaktives Antimycin oder ein radioaktives Antimycin-analogon eine photolabile Gruppe eingeführt werden, die unter Lichteinfluß zu einer kovalenten Bindung des Antimycins an sein Bindeprotein oder an ein sich in unmittelbarer Nähe befindliches Molekül führen würde. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung könnte die durch das Hemmstoffderivat markierte Untereinheit identifiziert werden. Durch eine Sequenzierung der markierten Untereinheit könnten sogar die Aminosäuren identifiziert werden, an die das radioaktive Antimycinderivat kovalent gebunden wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Salicylamidderivate, die nach Patel & Bendall (1986) und nach Wilson et al (1985) antimycinähnliche Eigenschaften besitzen, auf ihre hemmenden Eigenschaften in Hefe- und Rindmitochondrien und in Spinatthylakoiden untersucht. Von den untersuchten Salicylamidderivaten stellte 3,5 Dichlorsalicyl-i-pentylamid den besten Hemmstoff des mitochondrialen Elektronentransports dar, war aber dennoch um den Faktor 1000 weniger effizient als Antimycin.

Das von Wilson et al (1985) als Antimycinanalogon synthetisierte Azidosalicyl-N-(n-octadecyl)amid hemmte in eigenen Versuchen weder den mitochondrialen Elektronentransport in Hefe und Rind, noch den Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport. Wilson et al führten mit dieser Verbindung Photoaffinitätsmarkierungen in Chromatophoren von Rhodobacter sphaeroides durch. Sie erhielten eine Markierung bei 11 kD. Dieses 11 kD Protein kann jedoch nach neueren Ergebnissen nicht als das für die hemmende Wirkung von Antimycin verantwortliche Bindeprotein betrachtet werden, da Komplexe aus Paracoccus denitrificans und aus Rhodobacter capsulatus isoliert werden konnten, die keine Untereinheit im Bereich von 11 kD besitzen und dennoch hohe, antimycinempfindliche Aktivitäten aufweisen (Gabellini 1988, Yang et al 1987, Kurowski & Ludwig 1987).

Nachdem keines der Antimycinderivate nur annähernd die

hemmenden Eigenschaften von Antimycin aufwies, und Antimycin aufgrund seiner komplizierten Struktur nicht chemisch synthetisiert werden kann, wurde versucht, Antimycin in Streptomycetenkulturen radioaktiv zu markieren. Dafür wurden zunächst Methoden zur Quantifizierung und Charakterisierung von Antimycin entwickelt und etabliert. Das aus den Streptomycetenkulturen isolierte Antimycin hatte im Vergleich zu dem von Sigma oder Boehringer bezogenen folgende Eigenschaften:

- 1) HPLC Analysen ermöglichten die Charakterisierung von Antimycin, das immer als Isomergemisch vorliegt (Rieske, 1967). Die Zusammensetzung der Antimycinisomere variierte in Abhängigkeit von den verwendeten Nährmedien und unterschied sich immer von der des käuflichen Antimycins.
- 2) Das Absorptionsmaximum des isolierten Antimycins lag bei 340 nm im Gegensatz zu dem Maximum bei 320 nm des käuflichen Antimycins.
- 3) Das isolierte Antimycin hemmte bei 26 nM 50% des mitochondrialen Elektronentransports (bei 350 µg mitochondrialem Protein im Testansatz) und hatte damit einen I_{50} Wert, der sogar noch unter dem Wert liegt, der für das käufliche Antimycin ermittelt wurde.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß das aus den Streptomyceten isolierte Antimycin die gleichen hemmenden Eigenschaften hat wie das käufliche Antimycin, wurden die Streptomycetenkulturen mit ^{14}C und ^3H markierten Verbindungen versetzt, die nach Literaturangaben vermutlich in Antimycin eingebaut werden könnten (Neft & Farley 1972, Birch et al (1962)). Der Einsatz von ^3H markiertem Tryptophan ermöglichte schließlich bei Verwendung des Mediums 43 die Isolation von Antimycin mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 99 nCi/nMol (Tabelle 7).

Tabelle 7: Markierung von Antimycin, AA in Streptomycetenkulturen mit Hilfe von ^{14}C - und ^3H markierten Verbindungen. Die Menge der eingesetzten Radioaktivität ist in $\mu\text{Ci/ml}$ angegeben, die Zahl hinter der ml Angabe bezeichnet das bei diesem Versuch verwendete Medium.

Verbindung	$\mu\text{Ci/ml}$ Medium	max. gefundene spez. Aktivität
2- ^{14}C -Acetat	50 $\mu\text{Ci}/50$ ml 41	0.04 nCi/nMol AA
U- ^{14}C -Glycerin	25 $\mu\text{Ci}/50$ ml 43	0.07 nCi/nMol AA
U- ^{14}C -Leucin	25 $\mu\text{Ci}/50$ ml 41	0.03 nCi/nMol AA
D-1- ^{14}C -Mannit	25 $\mu\text{Ci}/50$ ml 41	0.04 nCi/nMol AA
L-U- ^{14}C -Phenylalanin	25 $\mu\text{Ci}/50$ ml 41	0.01 nCi/nMol AA
3- ^3H -Methionin	100 $\mu\text{Ci}/30$ ml 41	0.04 nCi/nMol AA
G- ^3H -Tryptophan	100 $\mu\text{Ci}/50$ ml 41	1.85 nCi/nMol AA
"	400 $\mu\text{Ci}/30$ ml 41	20 nCi/nMol AA
"	400 $\mu\text{Ci}/30$ ml 43	99 nCi/nMol AA

Damit stand erstmals in vivo synthetisiertes und somit natives Antimycin mit einer hohen spezifischen Aktivität zur Verfügung. Dadurch war der Nachweis von nur wenigen pMolen Antimycin möglich. Da mit diesem radioaktiven Antimycin auch Bindungsversuche an isolierten Cytochrom bc Komplexen durchgeführt werden sollten, mußte eine Methode entwickelt werden, durch die ungebundene Antimycinmoleküle von den Komplexen mit den gebundenen Molekülen getrennt werden. Diese Methode sollte zur besseren Vergleichbarkeit der Resultate für alle Cytochrom bc Komplexe anwendbar sein und unter schonenden Bedingungen erfolgen, sodaß eine Denaturierung der Komplexe vermieden wird. Die Cytochrom bc Komplexe haben ein Molekulargewicht von 280 kD (b_5f) und 500 kD (bc_1) (Mörschel & Staehelin 1983, Jagow et al 1977). Eine vollständige Pelletierung der Komplexe gelang innerhalb von wenigen Stunden in herkömmlichen UZ-Rotoren nicht. Es wurde versucht, die ungebundenen Antimycinmoleküle durch Gelfiltration abzutrennen, dabei traten jedoch zu starke Schwankungen auf. Mit Hilfe eines Vertikalrotors konnte schließlich die vollständige Pelletierung des Komplexes innerhalb von 2.3 Stunden erreicht werden und damit eine Bestimmung der ungebundenen und der freien Antimycinmoleküle ermöglicht werden.

Durch die Synthese von radioaktivem Antimycin, der Isolation

von Cytochrom bc Komplexen und der Etablierung einer Methode für die Bindungsversuche an den isolierten Komplexen waren hiermit die Voraussetzungen für die Untersuchung der Antimycinbindung geschaffen.

Die Bindung von Antimycin an Rind- und Hefemitochondrien zeigte den typischen Verlauf der Bindung eines hydrophoben Hemmstoffs an eine Membran. Die hochaffine Bindung von Antimycin ging bei höheren Antimycinkonzentrationen in eine Bindung mit niedriger Affinität über. Bei einer Auftragung der Bindungsdaten nach Scatchard zeigte sich eine positive Steigung im hochaffinen Bereich. Daraus folgt, daß die Bindung von Antimycin an Mitochondrien positiv kooperativ verläuft. Bei einer positiv kooperativen Bindung interagieren mindestens zwei Bindestellen so untereinander, daß die Bindung des ersten Moleküls die Bindung des zweiten Moleküls erleichtert. Es müssen folglich im Cytochrom bc₁ Komplex zwei Bindestellen für Antimycin vorhanden sein. In den Bindungsexperimenten mit Rindermitochondrien konnten jedoch nur 0.5 Mole Bindestellen/Mol Cytochrom b-Häm nachgewiesen werden, d.h. in einem Cytochrom bc₁ Komplex, der als Monomer vorliegt, wäre nur eine Bindestelle vorhanden. In einem funktionell dimeren Komplex könnten die zwei Bindestellen der beiden Monomeren dagegen positiv kooperieren. Auch in Bindungsexperimenten mit isoliertem Cytochrom bc₁ Komplex aus Rind und Hefe konnte die positiv kooperative Bindung von Antimycin bestätigt werden. Eigene Ergebnisse bestätigten hiermit die Modelle eines funktionell dimeren Cytochrom bc₁ Komplex von de Vries (1986) und Mitchell & Moyle (1985). In den vorliegenden Bindungsexperimenten konnten die Bindungskonstanten für Antimycin in Mitochondrien und Cytochrom bc₁ Komplexen bestimmt werden. In Rindermitochondrien war der pK_B Wert, der negativ dekadische Logarithmus der Bindungskonstante k_B, 8.3, in Hefemitochondrien lag der pK_B Wert mit 8.5 in der gleichen Größenordnung. In den Cytochrom bc₁ Komplexen aus Rind und Hefe lagen die pK_B Werte mit 9.0 in Rind und 9.8 in Hefe höher als die pK_B Werte, die für die Mitochondrien ermittelt wurden. Dies ist zu erwarten, da im Komplex III weniger unspezifische Bindestellen vorhanden sind als in Mitochondrien. Bei den gemeinsamen Arbeiten in Amsterdam

errechnete Dr. K. Krab freundlicherweise aus einigen der hier gewonnenen Daten Bindungskonstanten; für Rindermitochondrien erhielt er einen pK_B Wert von 8.0, der damit fast dem aus dem Scatchard Plot abgelesenen Wert entspricht.

Berden & Slater (1972) ermittelten für submitochondriale Partikel aus Rind die Bindungskonstanten und die Anzahl der Bindestellen mit fluorimetrischer Methode. Sie fanden ebenfalls 0.5 Mole Antimycinbindestellen/Mol Cytochrom b-Häm. Diese Stöchiometrie, die gerade im Hinblick auf den funktionell dimeren Komplex, der aufgrund der in der vorliegenden Arbeit gezeigten positiv kooperativen Bindung von Antimycin, gefordert wird, bedeutsam ist, konnte auch in Bindungsexperimenten von Tsai & Palmer (1986) nachgewiesen werden. In Versuchen, die die Menge von Antimycin/Komplex bestimmten, die für eine 100% Hemmung der Aktivität notwendig ist, wurde ebenfalls eine Stöchiometrie von einem Mol Antimycin/Komplex Monomer gefunden (Rieske 1976, Slater 1973, vorliegende Arbeit).

Berden & Slater (1972) erhielten für submitochondriale Partikel aus Rind einen pK_B Wert von 10.5, die Bindungskonstante ist damit um den Faktor 160 kleiner als die in dieser Arbeit ermittelte Bindungskonstante. Bei der Methode von Berden & Slater werden die ungebundenen Moleküle in Anwesenheit von Rinderserumalbumin fluorimetrisch bestimmt und der daraus ermittelte pK_B Wert für die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin korrigiert. In eigenen Experimenten wurde die Bindung von Antimycin an Rindermitochondrien auch in Anwesenheit von 1 mg/ml Rinderserumalbumin untersucht. Der in Anwesenheit von Rinderserumalbumin ermittelte pK_B Wert betrug 7.5 und war damit um einen Faktor 6 kleiner als der in Abwesenheit ermittelte. Die Bindung von Antimycin an Rinder-serumalbumin wurde bei der Bestimmung nicht berücksichtigt. Der so ermittelte pK_B Wert bestätigt die Resultate von Berden & Slater insofern, als sie einen pK_B Wert von ebenfalls 7.5 angeben, der noch nicht für die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin korrigiert wurde und von ihnen als apparenter pK_B Wert bezeichnet wird. Die Diskrepanz zwischen den Bindungskonstanten, die von Berden & Slater angegeben wurden und denen, die in der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden,

beruhen demnach in erster Linie auf der Korrekturberechnung für die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin.

Berden & Slater (1972) fanden nur in mit Succinat/KCN reduzierten submitochondrialen Partikeln eine positiv kooperative Bindung von Antimycin, nicht aber in oxidierten Partikeln. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Kontrollexperiment die Antimycinbindung an Rindermitochondrien untersucht, die durch 1 mM Ferricyanid (Oxidationsbedingungen von Berden & Slater) oxidiert vorlagen. Im Gegensatz zu den Experimenten von Berden & Slater konnte jedoch auch in oxidierten Rindermitochondrien eine positiv kooperative Bindung von Antimycin nachgewiesen werden.

Aus der positiv kooperativen Bindung von Antimycin, wie sie in dieser Arbeit für Cytochrom bc_1 Komplexe und Mitochondrien nachgewiesen werden konnte und der allgemein akzeptierten Stöchiometrie von 1 Mol Antimycin/Mol Komplexmonomer folgt ein Modell, bei dem zwei Antimycinbindestellen in einem dimeren Komplex kooperieren. Zwei unterschiedliche Bindestellen für Antimycin fordern auch Grimmelikhuijzen et al (1975). Sie untersuchten den Einfluß von Antimycin in *Candida utilis* Mutanten. Die Hemmung der Respiration durch Antimycin und der durch Antimycin induzierte 'red shift' des Cytochrom b_h Häms waren in den Mutanten nicht gleichermaßen verändert. Für zwei Bindestellen, die bei einer Stöchiometrie von einem Mol Antimycin/Komplex Monomer nur in einem funktionell dimeren Komplex verwirklicht sein können, sprechen auch die Versuche von Bryla & Kaniuga (1968). Antimycin gehemmte mitochondriale Partikel konnten in ihren Versuchen durch Etherextraktion fast vollständig reaktiviert werden, obwohl nur die Hälfte der gebundenen Antimycinmoleküle extrahiert waren.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich der Ergebnisse von Nelson et al (1972) und den in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimenten. Nelson et al untersuchten die Extraduktion von Cytochrom b in Succinat reduzierten submitochondrialen Partikeln nach der Zugabe von Antimycin. In Abwesenheit von Antimycin liegen in Succinat reduzierten Mitochondrien nur die Hämgruppe Cytochrom b_h mit dem elektro-positivem Redoxpotential reduziert vor, in Anwesenheit von

Antimycin dagegen beide Hämgruppen (Extrareduktion). Wenn Nelson et al weniger als 0.05 µg Antimycin/mg Partikelprotein zugaben, konnten sie keine Extrareduktion von Cytochrom b beobachten. 0.05 µg Antimycin entsprechen 0.1 nMol Antimycin. Dies ist genau die Menge an Antimycin, bei der unter Berücksichtigung des in den Bindungsversuchen eingesetzten mitochondrialen Proteins, die in dieser Arbeit erhaltene Kurve im Scatchard Plot in die Bindungsgerade mit hoher Affinität abknickt. Der von Nelson et al für die Extrareduktion von Cytochrom b angegebene 'Schwellenwert' entspricht also genau dem Wert, der in dieser Arbeit für die Besetzung der ersten Bindungsstelle in der positiv kooperativen Bindung von Antimycin bestimmt wurde. Die erst oberhalb des 'Schwellenwerts' von Nelson et al beobachtete Extrareduktion von Cytochrom b kann mit der positiv kooperativen Bindung von Antimycin erklärt werden: Nachdem die ersten Bindungsstellen besetzt sind, ändert sich die Bindungsaffinität der noch unbesetzten Bindungsstellen, was durch ein Abknicken der Bindungsgerade im Scatchard Plot deutlich wird. Erst bei Besetzung der zweiten Bindungsstelle im Dimer wird durch Antimycin die Extrareduktion von Cytochrom b ausgelöst.

Als Argument gegen funktionell dimere Cytochrom bc₁ Komplexe werden die Versuche von Nalecz & Azzi (1985) an monomeren und dimeren Cytochrom bc₁ Komplexen gesehen. Diese Versuche konnten jedoch nicht von de Vries (1986) bestätigt werden.

Für einen funktionell dimeren Komplex sprechen auch die Ergebnisse von Weiss et al (1987): Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Membrankristallen von Neurospora crassa lassen einen dimeren Cytochrom bc₁ Komplex erkennen.

Darüberhinaus rekonstituierten sie dimere Cytochrom bc₁ Subkomplexe, die nur Cytochrom b und c₁ enthielten, mit monomeren bzw. dimeren Rieske und Core Proteinen. Für eine Rekonstitution der 'steady state' Aktivität mußten alle Subkomplexe des Komplex III als Dimer vorliegen.

Zusammenfassend wird in dieser Arbeit ein funktionell dimerer Cytochrom bc₁ Komplex gefordert, der zwei unterschiedliche Antimycinbindestelle/Komplexdimer enthält und Antimycin positiv kooperativ bindet.

In Antimycinbindestudien an Spinatthylakoiden wurde überprüft, ob auch dort eine positiv kooperative Bindung und darüberhinaus eine spezifische Bindung an Cytochrom b_6f komplex nachgewiesen werden kann. Auf den ersten Blick gleicht die Bindungskurve von Antimycin an Spinatthylakoiden der mitochondrialen. Bei Auftragung der Bindungsdaten im Woolf-Augustinsson-Hofstee Plot wird jedoch deutlich, daß in Spinatthylakoiden die Bindung von Antimycin nicht kooperativ verläuft und damit ein wesentlicher Unterschied zwischen der Bindung an Spinatthylakoiden und der an Mitochondrien vorliegt. Die Bindungskonstante für Antimycin in Spinatthylakoiden, die sich aus der Auftragung nach Woolf-Augustinsson-Hofstee ergibt, ist mit einem Wert von 50 nM um einen Faktor 10 größer als in Rindermitochondrien, d.h. die Affinität gegenüber Antimycin ist in Spinatthylakoiden geringer. Diese Bindungsdaten wurden freundlicherweise von Dr. K. Krab, Amsterdam ausgewertet. Er erhält einen pK_B Wert von 8.0, der damit genau dem von Rindermitochondrien entspricht. Mills et al (1978) bestimmten in Anwesenheit von 1 mg/ml Rinderserumalbumin die Bindung von Antimycin an Spinatthylakoiden und gaben als pK_B Wert 8.4 an; dieser Wert war für die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin korrigiert worden. Der apparente pK_B Wert war in ihren Versuchen 6.3. Dieser für die Bindung von Antimycin an Rinderserumalbumin nicht korrigierte pK_B Wert konnte in der vorliegenden Arbeit durch eine Antimycinbindung mit 1 mg/ml Rinderserumalbumin nicht bestätigt werden. Auch mit Rinderserumalbumin wurde ein pK_B Wert von 7.3 in Spinatthylakoiden gefunden, der damit genau dem in Abwesenheit von Rinderserumalbumin bestimmten pK_B Wert entsprach.

Die Antimycinbindung in Spinatthylakoiden unterscheidet sich also von der in Mitochondrien nicht nur dadurch, daß sie in Ab- und Anwesenheit von Rinderserumalbumin mit gleicher Kinetik erfolgt, sondern auch darin, daß sie keine Kooperativität aufweist.

Um zu klären, ob Antimycin an den Cytochrom b_6f Komplex bindet oder nicht, wurden in der vorliegenden Arbeit Bindungs-experimente mit dem isolierten Komplex durchgeführt. Vergleicht man die Bindungskurven, die man mit den mitochondrialen

man die Bindungskurven, die man mit den mitochondrialen Komplexen erhält mit denen, die sich für den Cytochrom b_6f Komplex ergeben, so ist eindeutig zu erkennen, daß keine spezifische Bindung von Antimycin an den Cytochrom b_6f Komplex erfolgt. Auch Dr.K.Krab konnte mit seiner Form der Michaelis-Menten Auswertung keine spezifische Bindung von Antimycin nachweisen.

Da am Cytochrom b_6f Komplex keine spezifische Antimycinbindung nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob die an Spinatthylakoiden beobachtete, hochaffine Antimycinbindung in anderen isolierten Komplexen der Thylakoidmembran wiedergefunden werden kann. Aus Spinatthylakoiden konnten mit Hilfe von Detergenzien und differentieller Zentrifugation Photosystem II Partikel und in Zusammenarbeit mit Dr.K.Krab Photosystem I Vesikel isoliert werden. Da Photosystem II nicht an dem Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport, der durch Antimycin gehemmt werden kann, beteiligt ist, würde man erwarten, daß Antimycin nicht an Photosystem II Partikel bindet. Bindungsexperimente zeigten jedoch, daß Photosystem II Partikel Antimycin mit einem pK_B Wert von 8.1 mit hoher Affinität bindet. (Dr.K.Krab erhielt bei der Auswertung dieser Versuchswerte einen pK_B Wert von 8.3.) Da keine Hemmung von Photosystem II durch Antimycin bekannt ist und auch kein Cytochrom b_6f Komplex in den Partikeln nachweisbar war, könnte die Bindung von Antimycin nur erklärt werden, wenn eine Bindungsstelle durch Antimycin spezifisch besetzt wird, jedoch nicht zu einer Hemmung des Elektronentransports führt. DCMU hemmt die Plastochinonreduktion in Photosystem II und bindet an das Herbizidbindepotein D1. In einem Verdrängungsexperiment sollte überprüft werden, ob Antimycin ebenfalls an das D1 Protein bindet, jedoch nicht zu einer Hemmung führt. Es konnte jedoch keine Verdrängung von DCMU durch Antimycin in Photosystem II Partikeln nachgewiesen werden.

Die in Spinatthylakoiden und in Photosystem II gemessene Bindung hat jedoch den typischen Verlauf einer Bindungskurve für einen spezifischen Hemmstoff. Möglicherweise bindet Antimycin in Spinatthylakoiden und in Photosystem II mit hoher

Antimycinbindung unterstreichen Ergebnisse von Gregory & Berry (1986). Ihren Experimenten zufolge wird Antimycin in Anwesenheit von C₁₂-C₁₈-Fettsäuren zwar gleichermaßen an die innere Mitochondrienmembran gebunden wie in deren Abwesenheit, es verliert jedoch seine hemmenden Eigenschaften in Anwesenheit der Fettsäuren. Die Bedeutung der Phospholipide bei der Hemmwirkung eines mitochondrialen Hemmstoffs unterstreichen auch Photoaffinitätsmarkierungen mit einem Derivat des mitochondrialen Hemmstoffs UHDBT (Yang et al 1986). Sie vermuten, daß die Hemmwirkung von UHDBT auf eine Bindung an Phospholipide zurückzuführen ist, die durch eine enge Assoziation Einfluß auf das Rieske Protein ausüben. Die eigenen Versuche können vielleicht durch eine spezifische Antimycinbindung an Lipide, die in Photosystem II und in Spinatthylakoiden gleichermaßen vorhanden sind, erklärt werden. Nur an dem durch Antimycin gehemmten Protein würde jedoch eine Interaktion zwischen den Fettsäuren, die Antimycin gebunden haben und diesem Protein stattfinden und zu einer Hemmung führen.

In Thylakoiden liegt nicht nur eine laterale Asymmetrie der Membranproteine, sondern auch der Acyllipide vor (Murphy 1986). Die Zusammensetzung der Acyllipide ist somit in Photosystem I und II Partikeln unterschiedlich. Photosystem I Vesikel enthalten neben dem Photosystem I den Cytochrom b₆f Komplex und damit alle für den Ferredoxin abhängigen, zyklischen Elektronentransport notwendigen Membranproteine. Dementsprechend würde man eine hochaffine Bindung von Antimycin an Photosystem I Vesikel erwarten. Bindungsexperimente mit Photosystem I Vesikeln zeigten einen ganz anderen Verlauf als die Bindungsexperimente mit Spinatthylakoiden und Photosystem II Partikeln. Entgegen den Erwartungen konnte überhaupt keine spezifische Bindung von Antimycin an Photosystem I Vesikeln festgestellt werden, obwohl deren Antimycinempfindlichkeit nachgewiesen werden konnte. Die beobachtete, hochaffine Antimycinbindung an Thylakoiden und Photosystem II Partikeln scheint nicht die Bindung wiederzugeben, die für die hemmende Wirkung von Antimycin im Ferredoxin abhängigen Elektronentransport verantwortlich ist, da sie nicht an Photosystem I Vesikeln auftritt. Die Bindung von Antimycin an Photosystem I Partikel, die erfolgen muß, da sonst

keine Hemmung durch Antimycin denkbar ist, kann nicht nachgewiesen werden, da sie wahrscheinlich durch unspezifische Bindung des Antimycins überdeckt wird. (Auch Dr.K.Krab konnte mit den hier gewonnen Daten keine hochaffine Bindung von Antimycin an Photosystem I Vesikeln feststellen.) Die in Spinatthylakoiden und Photosystem II Partikeln beobachtete hochaffine Antimycinbindung deutet auf eine bisher nicht charakterisierte Bindestelle in Photosystem II hin. Da in Photosystem I Vesikeln keine Antimycinbindung nachgewiesen werden konnte, stellt sich die Frage, ob aus der nicht nachweisbaren Antimycinbindung am Cytochrom b_6f Komplex tatsächlich der Schluß gezogen werden kann, daß Antimycin nicht an der Q_i -Seite im Cytochrom b_6f Komplex bindet. In diesem Zusammenhang sind die Experimente von de Wolf et al (1985) interessant, die an Photosystem I Vesikeln den Ferredoxin abhängigen Elektronentransport untersuchten und keine Antimycinempfindlichkeit in diesem System nachweisen konnten. Unter bestimmten Bedingungen scheinen demnach der Cytochrom b_6f Komplex und Photosystem I in ihren Funktionen unverändert zu sein, aber ihre Antimycinempfindlichkeit zu verlieren. Auch die Arbeiten von Hosler & Yocum (1985, 1987) zeigten, daß es zwei unterschiedliche Ferredoxin abhängige, zyklische Systeme gibt, von denen das eine durch Antimycin gehemmt wird, das andere nicht. Welches der beiden Ferredoxin zyklischen Systeme in Spinatthylakoiden aktiv ist, hängt nach ihren Untersuchungen von dem ATP/ADP und dem NADPH/NADP Verhältnis ab. Vielleicht liegt bei dem antimycinunempfindlichen Weg eine Konformationsänderung vor, die zur Auflösung oder Verdeckung der Antimycinbindestelle führt.

Die Frage, an welches Protein der Thylakoidmembran Antimycin bindet, könnte durch Photoaffinitätsmarkierung mit einem radioaktiven Antimycinderivat beantwortet werden. Solche Antimycin-Photoaffinitätsmarkierungen wurden von Wilson et al (1985) mit einem Azidosalicylamidderivat durchgeführt, das jedoch in der vorliegenden Arbeit weder Mitochondrien noch die Ferredoxin abhängige Photophosphorylierung hemmte und damit nicht als Antimycinanalogon betrachtet werden kann. Weitere

Photoaffinitätsmarkierungen zur Identifizierung der Antimycinbindestelle wurden von Ho et al 1985 durchgeführt. Die radioaktive Markierung des Antimycins erreichten sie durch eine Wilsbach-Tritierung und führten dann in das radioaktive Antimycin anstelle der Formamidogruppe eine Azidogruppe ein. Mit diesem Deformamidoazidoantimycin erhielten sie im mitochondrialen Cytochrom bc₁ Komplex eine Markierung bei 13 und etwas schwächer bei 16 kD. Gegen eine Beteiligung der kleinen Untereinheiten spricht jedoch, daß inzwischen Cytochrom bc₁ Komplexe aus Rhodobacter capsulatus und aus Paracoccus denitrificans isoliert werden konnten, die hohe, antimycinempfindliche Aktivitäten aufweisen, aber keine kleinen Untereinheiten besitzen (Yang et al 1987, Gabellini 1988, Kurowski & Ludwig 1987). Es könnte sein, daß bei der Wilsbach Tritierung eine Veränderung des Antimycinmoleküls erfolgte und darauf die unbefriedigenden Ergebnisse zurückgeführt werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht aus dem Antimycin, das aus Streptomycetenkulturen gewonnen wurde, diese 'Rieske'-Verbindung, Deformamidoazidoantimycin, herzustellen. Anstelle des Antimycins, das durch eine Wilsbach Tritierung hergestellt und dabei eventuell verändert wurde, sollte das in dieser Arbeit in vivo synthetisierte Antimycin verwendet werden. Deformamidoazidoantimycin erwies sich in Rindermitchondrien mit einem I₅₀ Wert von 90 nM als sehr guter Hemmstoff. Leider gelang die Synthese von Deformamidoazidoantimycin nur bei Antimycin, das von Sigma bezogen wurde und nicht bei dem aus Streptomycetenkulturen isolierten Antimycin. Dies könnte auf die unterschiedliche Isomerenzusammensetzung, die in HPLC Analysen gezeigt werden konnte, zurückzuführen sein, oder aber auf eine geringe Verunreinigung des isolierten Antimycins. Eine präparative Reinigung und Auftrennung der Antimycinisomere durch HPLC könnte vielleicht die Synthese ermöglichen und somit Photoaffinitätsmarkierungen mit einem Antimycinderivat, das aus nativem Antimycin mit hoher spezifische Aktivität hergestellt wurde, erlauben.

Als weitere Zugang zur Charakterisierung der Chinonbindestellen

im mitochondrialen Cytochrom bc_1 Komplex wurde die Hemmung und Bindestelle von DCMU untersucht. DCMU hemmt in Hefe, nicht aber in Rind den mitochondrialen Elektronentransport. Die DNA Sequenzen von Hefemutanten, die DCMU resistent sind, wurden von di Rago et al (1986) ermittelt. Die Mutationen der DCMU resistenten Mutanten liegen alle im Exon 1 oder im Exon 4 des Cytochrom b. Nach dem Modell von Widger et al (1985), das in der von Crofts et al (1987) modifizierten Form in Abb. 67 wiedergegeben ist, liegen alle Mutationen, die zur DCMU Resistenz führen, auf der cytoplasmatischen Seite, auf der sich auch die chinoloxidierende Q_o -Seite befindet. In Photosystem II wird an der Q_A/Q_B -Seite Plastochinon reduziert und diese Reduktion durch DCMU gehemmt. In Analogie dazu würde man eine Hemmung der Chinonreduktion im Cytochrom bc_1 Komplex erwarten und damit eine Bindung von DCMU an der Q_i -Seite. Stigmatellin hemmt in Photosystem II ebenfalls die Plastochinonreduktion, blockiert aber in Cytochrom bc_1 und Cytochrom b_6f Komplexen die chinoloxidierende Q_o -Seite (Oettmeier et al 1985, von Jagow & Link 1986). Ein Hemmstoff, der die Reduktion von Plastochinon in Photosystem II hemmt, kann demnach in Cytochrom bc Komplexen an der chinonoxidierenden Seite hemmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von DCMU auf die Q_o - und die Q_i -Seite in Hefemitochondrien und isoliertem Komplex III aus Hefe untersucht. Für diese Arbeit stand die DCMU resistente Mutante Diu 2-766 zur Verfügung. Die Mutation im Exon I des Gens für Cytochrom b führt zum Austausch der Aminosäure 17 Isoleucin gegen Phenylalanin.

Die Mitochondrien, die aus der Mutante Diu 2-766 gewonnen wurden, besaßen die gleiche Aktivität wie die aus dem Wildtyp isolierten. Die Hefemutante Diu 2-766 zeigte keinerlei Kreuzresistenz gegenüber Antimycin, Myxothiazol oder HQNO. Dies widerspricht den Ergebnissen von Briquet & Gouffreau (1981), die für alle DCMU resistenten Hefemutanten eine Kreuzresistenz gegenüber HQNO festgestellt haben und fordern, daß DCMU Bindestellen auch HQNO Bindestellen sind. Ihre Versuche führten sie nicht mit der hier verwendeten Diu 2-766 Mutante durch, sondern mit anderen Hefemutanten, deren DCMU Resistenz ebenfalls auf Mutationen im Gen für Cytochrom b zurückgeführt werden.

wurde genauer mit dem von Alexandre & Lehninger (1984) beschriebenen 'DCPIPH₂ bypass' untersucht. Alexandre & Lehninger zeigten, daß die Hemmung des mitochondrialen Elektronentransports durch Antimycin mit Hilfe von DCPIPH₂ aufgehoben werden kann. Dabei wird das am Qo-Zentrum entstandene Semichinon durch DCPIPH₂ reduziert. Cytochrom b wird dementsprechend nicht reduziert und muß nicht am Qi-Zentrum reoxidiert werden. Das Qi-Zentrum ist folglich in Anwesenheit von DCPIPH₂ nicht am Elektronentransport beteiligt. Dieser 'DCPIPH₂ bypass' wird durch Myxothiazol gehemmt. In der vorliegenden Arbeit konnte die DCMU Hemmung in Hefemitochondrien durch DCPIPH₂ aufgehoben werden. Die reaktivierte Rate wurde durch Myxothiazol gehemmt. Aus diesen Experimenten folgt, daß sich DCMU in Hefemitochondrien wie Antimycin verhält und an der Qi-Seite hemmt.

In 'steady state' Versuchen mit isoliertem Komplex III wurde die Wirkung von DCMU mit der von Antimycin verglichen. Zunächst wurde die Reduktion von Cytochrom b in Anwesenheit von charakterisierten Hemmstoffen verfolgt. Wie erwartet, konnte nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von Myxothiazol und von Antimycin die Cytochrom b Reduktion verhindert werden. Die Qo-Seite war durch Myxothiazol, die Qi-Seite durch Antimycin blockiert. In Kombination mit Antimycin konnte DCMU die Reduktion von Cytochrom b nicht verhindern, dies spricht für eine Blockierung der Qi-Seite durch DCMU. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Myxothiazol und DCMU wurde jedoch Cytochrom b ebenfalls reduziert, dies spricht gegen eine Blockierung der Qi-Seite. DCMU kann folglich weder Myxothiazol noch Antimycin bei der Blockierung der Cytochrom b Reduktion ersetzen. Die Wirkung von DCMU im Cytochrom bc₁ Komplex sollte durch Versuche zur 'oxidant-induced-reduction' weiter charakterisiert werden. Das Phänomen der 'oxidant-induced-reduction' stellt sich folgendermaßen dar: In Abwesenheit eines künstlichen Elektronenakzeptors liegen nach der Zugabe eines Elektronendonors das Rieske Protein, das Cytochrom c₁ und die Cytochrom b_L Hämgruppe reduziert vor. In Anwesenheit von Antimycin wird die Reoxidation von Cytochrom b blockiert und die Zugabe eines Oxidans führt zu einer Oxidation des Rieske Proteins und des

Cytochrom c_1 . Ubichinol kann daraufhin wieder am Q_o -Zentrum oxidiert werden, die Cytochrom b_1 Hämgruppe wird durch das entstandene Semichinon reduziert und kann, da in Anwesenheit von Antimycin die Cytochrom b_1 Hämgruppe reduziert bleibt, nicht wieder oxidiert werden. Die Oxidation des Rieske Proteins führt damit zur Reduktion der beiden Hämgruppen von Cytochrom b . In der vorliegenden Arbeit konnte eine 'oxidant-induced-reduction' in Anwesenheit von Antimycin in Komplex III beobachtet werden. DCMU führte ebenfalls zu einer Extrareduktion von Cytochrom b . Diese unterschied sich jedoch von der durch Antimycin induzierten Extrareduktion. Nach Reduktion des Komplex III durch Ubichinol und Zugabe von Antimycin, erfolgte die 'oxidant-induced-reduction' erst nach Zugabe des Oxidans Ferricyanid. Die Zugabe von DCMU führt hingegen sofort, d.h. ohne Zugabe eines Oxidans zur Extrareduktion von Cytochrom b . Eine Extrareduktion des Cytochrom b durch DCMU in Hefemitochondrien beobachteten Briquet & Gouffreau bereits 1981. Da jedoch in ihren Versuchen immer das Oxidans gleichzeitig mit DCMU zugegeben wurde, stellten sie keinen Unterschied zwischen DCMU und Antimycin hinsichtlich der Extrareduktion von Cytochrom b fest. Da die Extrareduktion durch DCMU auch ohne Oxidans induziert wird, muß DCMU auch die Q_o -Seite beeinflussen und dort die Oxidation des Rieske Proteins oder des Cytochrom c_1 bewirken.

Zusammenfassend folgt aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten, daß DCMU die Oxidation der Cytochrom b_1 Gruppe am Q_i -Zentrum blockieren kann und damit eine Extrareduktion auslösen kann, aber nicht die Reduktion von Cytochrom b über das Q_i -Zentrum verhindern kann, da bei gleichzeitiger Anwesenheit von Myxothiazol und DCMU Cytochrom b reduziert wurde. Darüberhinaus muß auch ein Einfluß von DCMU auf die Q_o -Seite gefordert werden, da kein Oxidans bei der durch DCMU induzierten Extrareduktion von Cytochrom b notwendig war. Würde man zunächst von der Bindung von DCMU an der Q_i -Seite ausgehen, so müßte diese Bindung eine Wirkung auf das Q_o -Zentrum auf der anderen Seite der Membran haben. Solch ein Fall, nämlich, daß das Q_i -Zentrum an der Matrixseite durch eine veränderte Aminosäure, die nach dem Modell in Abb. 67 auf der cytosolischen Seite liegt,

beeinflusst wird, ist in HQNO resistenten Mutanten aus Maus L-Zellen bekannt. Die Mutation auf der cytosolischen Seite führt zur Resistenz gegenüber HQNO, einem Hemmstoff der Qi-Seite (Howell et al 1987). Eine Beeinflussung der beiden Zentren über die Membran haben auch die Experimente von Japa et al (1987) gezeigt. Ein Antikörper gegen ein 15 kD Protein bindet an der Matrixseite in Hefemitochondrien, beeinflusst aber die Katalyse am Qo-Zentrum, das der cytosolischen Seite zugewandt ist.

Zur weiteren Charakterisierung der DCMU Bindestelle wurden Bindungsversuche mit radioaktivem DCMU an Hefemitochondrien durchgeführt. Es gelang jedoch nicht, eine spezifische Bindung von DCMU in Mitochondrien nachzuweisen, da diese durch unspezifische Bindungen überlagert wurde. Mit Hilfe von Photoaffinitätsmarkierungen mit zwei unterschiedlichen DCMU Derivaten gelang die Identifizierung der DCMU Bindestelle. Die DCMU Derivate unterschieden sich durch die Position der photolabilen Azidogruppe, die sich in meta bzw. para Stellung befand. Mit Hefemitochondrien aus dem Wildtypstamm und aus der DCMU resistenten Mutante Diu 2-766 wurden Photoaffinitätsmarkierungen mit beiden DCMU Derivaten durchgeführt. Sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante wurden durch beide Azidomonurone ein Protein mit einem Molekulargewicht von 30 kD markiert. Cytochrom b hat ein Molekulargewicht von 43 kD, läuft aber im SDS-Polyacrylamidgel bei 30 kD zusammen mit Cytochrom c₁ (Ljungdahl et al 1986). Komplex III, der aus einem Wildtyphefestamm isoliert wurde, wurde ebenfalls mit den Azido DCMU Derivaten markiert. Auch dort ließ sich eine Markierung im Bereich von 30 kD erkennen. Dies bestätigt die Vermutung, daß es sich um Cytochrom b handeln könnte.

Die Markierung in der DCMU resistenten Mutante kann nur erklärt werden, wenn man annimmt, daß DCMU an der Mutante gleichermaßen bindet, aber nicht zu einer Hemmung führt. Solch ein Fall wurde für eine *Candida utilis* Mutante von Grimmelikhuijzen et al (1975) beobachtet. Die Mutante wies eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber Antimycin auf. In Bindungsversuchen konnte jedoch gezeigt werden, daß die Mutante Antimycin gleichermaßen bindet wie der Wildtypstamm. Da keine spezifische DCMU-Bindung

in Wildtypmitochondrien in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte, konnte diese nicht mit der in der Mutante verglichen werden. Somit konnte die in der Mutante gleichermaßen auftretende Markierung im Bereich von 30 kD nicht abschließend erklärt werden.

Die Relevanz der 30 kD Markierung wird durch Photoaffinitätsmarkierungen von Rindermitchondrien und Komplex III aus Rind unterstrichen. Komplex III aus Rind ist nicht DCMU empfindlich und es war auch keine spezifische Markierung in Mitochondrien und Komplex III aus Rind durch die DCMU Derivate zu erkennen. Aufgrund der DCMU resistenten Hefemutanten, bei denen Mutationen im Gen für Cytochrom b für die DCMU Resistenz verantwortlich gemacht werden, ist es wahrscheinlich Cytochrom b, das durch DCMU markiert wird und nicht Cytochrom c₁, das auf gleicher Höhe im SDS-Gelsystem läuft. Eine endgültige Bestätigung dafür könnte eine Sequenzierung des markierten Proteins liefern, die darüberhinaus Auskunft über die Bindestelle geben könnte, wie dies im Falle von Photosystem II gelungen ist. Die Sequenzierung des isolierten 30 kD Proteins gelang jedoch nicht. Im Gasphasensequenzator brach die Sequenzierung schon beim ersten Durchgang ab, wahrscheinlich war das 30 kD Protein N-terminal blockiert.

Bei den Photoaffinitätsmarkierungen, die mit 3-[¹⁴C]-Azido-DCMU an Hefemitochondrien durchgeführt wurden, war außerdem noch eine Bande im Bereich von 15 kD markiert. Auch diese Bande bei 15 kD war in Mitochondrien aus dem Wildtypstamm genauso stark markiert wie in denen aus der DCMU resistenten Mutante. Komplex III aus Hefe zeigte allerdings keine Markierung im Bereich von 15 kD. Photoaffinitätsmarkierungen mit 2-[¹⁴C]-Azidomonuron ließen keine Markierung im Bereich von 15 kD erkennen.

DCMU kann in Plastochinon verarmten Thylakoiden durch ein Plastochinonanalogon verdrängt werden (1984). Aufgrund seiner Hemmeigenschaften im Cytochrom bc₁ Komplex aus Hefe könnte man sich in Analogie dazu vorstellen, daß DCMU Ubichinonbindestellen besetzt. Von King et al (1985) konnte gezeigt werden, daß ein 15 kD Protein für die Aktivität des Cytochrom bc₁ Komplexes notwendig ist. Da man in EPR Studien eine Anisotropie

der Semichinonradikale beobachtet, fordert er Ubichinonbindeproteine, die die Semichinonradikale stabilisieren. Sowohl für die NADH Dehydrogenase, die Succinatdehydrogenase als auch für den Komplex III konnte er jeweils spezifische, niedermolekulare Proteine isolieren, die für die Aktivität essentiell sind und als Ubichinonbindeproteine fungieren sollen.

Photoaffinitätsmarkierungen mit einem Plastochinonazidderivat führten in Spinatthylakoiden zu einer Markierung des Cytochrom b_6 und des Rieske Proteins (Oettmeier et al 1982). In dieser Arbeit wurden Hefemitochondrien aus dem Wildtypstamm und Rindermitochondrien mit dem Plastochinonazid von Oettmeier et al (1982) markiert. In Hefemitochondrien wurde dieselbe Bande bei 30 kD markiert wie durch Azidomonuron. Eine weitere Markierung befand sich ebenso wie bei der Markierung mit 3-Azidomonuron im Bereich von 15 kD. In Rindermitochondrien wurde ein Protein im Bereich von 37 kD markiert. Yu et al führten Photoaffinitätsmarkierungen mit einem Azido-Ubichinonderivat an Komplex III aus Hefe durch und fanden ebenfalls Cytochrom b und ein Protein von 14 kD markiert (1986). Zhu & Beattie fanden 1988, daß die Reduktion von Chinonen durch Succinat antimycinempfindlich, die Reduktion durch NADH myxothiazolempfindlich ist. Sie folgerten aus diesen Ergebnissen und der Isolation von Suprakomplexen, die aus Komplex I und III bzw. aus Komplex III und II bestehen, daß die Succinatdehydrogenase funktionell mit dem Q_i -Zentrum interagiert, die NADH Dehydrogenase dagegen mit dem Q_o -Zentrum. Man könnte die Markierung des 15 kD Proteins durch 3-[^{14}C]-Azidomonuron, die nur in Hefemitochondrien nicht aber in Komplex III aus Hefe auftritt, eventuell damit erklären, daß unter der Annahme, daß DCMU an der Q_i -Seite bindet, in Mitochondrien das Ubichinonbindeprotein der, mit dem Q_i -Zentrum assoziierten, Succinatdehydrogenase durch DCMU markiert wird. Das Ubichinonbindeprotein der Succinatdehydrogenase hat ein Molekulargewicht von 13-15 kD (King 1985). Im Komplex III dagegen ist die Succinatdehydrogenase nicht vorhanden und folglich wird auch deren Ubichinonbindeprotein nicht markiert. Nimmt man hingegen an, daß DCMU an der Q_o -Seite bindet, würde das Ubichinonbindeprotein der NADH Dehydrogenase, die mit dem Q_o -Zentrum assoziiert ist, markiert.

5. ZUSAMMENFASSUNG:

An der Energiekonservierung im photosynthetischen und mitochondrialen Elektronentransport sind mehrere Multienzymkomplexe beteiligt. Dabei stellen die ATP Synthetase und der Cytochrom bc Komplex ubiquitäre Proteinkomplexe dar. Der plastidäre Cytochrom b₆f Komplex ist dem mitochondrialen Cytochrom bc₁ Komplex in Struktur und Funktion homolog. Der Mechanismus, mit dem diese Komplexe einen Zwei-Elektronenüberträger, ein Ubi- bzw. Plastohydrochinon oxidieren und die Elektronen auf einen Ein-Elektronenüberträger, einem Cytochrom c-Typ (Cyt.c₁ bzw. Cyt.f) übertragen, ist in wichtigen Details noch immer unklar. Es existieren mehrere Vorschläge wie z.B. der Q-Zyklus, der Semichinonzyklus oder der dimere Q-Zyklus. Diese Modelle müssen erklären, wie bei der Reduktion von einem Cytochrom c₁ bzw. Cytochrom f durch ein Hydrochinon mit jedem Elektron nicht nur ein, sondern zwei Protonen über die Membran transportiert werden. Deshalb werden zwei Chinonbindestellen gefordert: eine hydrochinonoxidierende und zusätzlich eine chinonreduzierende. An diesen zwei Chinonbindestellen soll nach dem heutigen Wissensstand das Cytochrom b mit seinen zwei unterschiedlichen Hämgruppen beteiligt sein - auf der einen Seite der Membran als Elektronenakzeptor, auf der anderen als Elektronendonator. Als experimenteller Zugang zu dieser Arbeit wurden Hemmstoffe verwendet, die an den Chinonbindestellen wirken. In dieser Arbeit standen die Hemmstoffe DCMU und Antimycin aus zwei Gründen im Mittelpunkt:

- 1) Sie beeinflussen die gesuchte, chinonreduzierende Seite, die bei der Diskussion über den Mechanismus der Energiekonservierung im Mittelpunkt steht.
- 2) DCMU und Antimycin haben nicht in allen Cytochrom bc Komplexen dieselbe Wirkung. Das deutet auf einen Unterschied in der Komplexstruktur und damit eventuell auch auf verschiedene Mechanismen hin.

Die Charakterisierung der Bindungskinetik und die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren erfordert eine radioaktive Markierung des Hemmstoffs. Erstmals konnte in dieser Arbeit Antimycin aus Streptomycetenkulturen durch Zugabe

von ^3H -Tryptophan mit einer spezifischen Aktivität von bis zu 99 nCi/nMol isoliert werden. Mit diesem radioaktiven Antimycin wurden die Bindungskinetik an Mitochondrien aus Rind und Hefe und den daraus isolierten Cytochrom bc_1 Komplexen untersucht:

1) Die Anzahl der Bindestellen ist 1 Mol Antimycin/ Cytochrom bc_1 Komplexmonomer.

2) Die Bindung verläuft positiv kooperativ.

Bei einer positiv kooperativen Bindung müssen aber mindestens zwei Bindestellen mit unterschiedlicher Affinität vorhanden sein. Deswegen wird ein funktionell dimerer Cytochrom bc_1 Komplex im respiratorischen Elektronentransport gefordert, in dem die beiden Monomere der chinonreduzierenden Seite kooperativ Antimycin binden und der Elektronen- und Protonentransport nach dem Modell des dimeren Q-Zyklus verläuft.

Im photosynthetischen Elektronentransport hemmt Antimycin zwar nicht den linearen Elektronentransport, es hat jedoch einen Einfluß auf den Transport von Protonen durch den Cytochrom b_6f Komplex und es hemmt den ferredoxinabhängigen, zyklischen Elektronentransport. Die Bindungsstudien mit Antimycin zeigen:

1) An Spinatthylakoide zeigte sich eine hochaffine Antimycinbindung, die jedoch in Gegensatz zu der mitochondrialen keine positive Kooperativität aufwies.

2) Am isolierten Cytochrom b_6f Komplex kann keine hochaffine Bindung von Antimycin nachgewiesen werden.

Die Antimycinbindung an Thylakoide scheint nicht die Eigenschaft der Bindung wiederzugegeben, die für die Hemmung des ferredoxinabhängigen Elektronentransports verantwortlich ist, da weder am isolierten Cytochrom b_6f Komplex noch an isolierten, ATP synthetisierenden Photosystem I Vesikeln eine hochaffine Antimycinbindung gezeigt werden konnte. Dagegen liegt in isolierten Photosystem II Partikeln, für die bisher keine Antimycinbindestelle charakterisiert wurde, dieselbe Antimycinbindungskinetik wie in Spinatthylakoiden vor.

Für Photoaffinitätsmarkierungen zur Identifizierung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren, die zumindest in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums liegen müssen, wurde versucht in das radioaktiv synthetisierte Antimycin eine Azidogruppe einzuführen. Die chemische Synthese gelang jedoch nicht.

DCMU beeinflusst im Cytochrom bc_1 Komplex aus Hefe sowohl die chinonreduzierende als auch die hydrochinonoxidierende Seite, wie 'steady state' Messungen zeigen. Zwei unterschiedliche, radioaktive Azido-Monuronen markieren sowohl in Mitochondrien aus einem Wildtypstamm, als auch in Mitochondrien aus einem DCMU resistenten Hefestamm ein 30 kD Protein. Bei diesem Protein handelt es sich höchstwahrscheinlich um Cytochrom b. Darüberhinaus tritt durch 3-Azido-Monuron eine Markierung eines Proteins mit 15 kD auf. Im Gegensatz zu der bei 30 kD wird das 15 kD Protein nur in Mitochondrien aus Hefe, nicht aber im isolierten Cytochrom bc_1 Komplex markiert. In Mitochondrien und Cytochrom bc_1 Komplex aus Rind, die DCMU unempfindlich sind, trat keine Markierung in Bereich von 30 kD auf. Eine Sequenzierung des markierten, isolierten 30 kD Proteins gelang nicht, da es wahrscheinlich N-terminal blockiert ist.

Radioaktives Plastochinonazid markierte in Hefemitochondrien dieselben Banden bei 30 und 15 kD wie Azido-Monuron. Dies bestätigt die Vermutung, daß es sich bei dem 30 kD Protein um Cytochrom b handelt und das auch in Hefemitochondrien DCMU mit einer Chinonbindestelle interagiert. Das markierte 15 kD Protein ist wahrscheinlich ein Ubichinonbindeprotein der Succinat- oder der NADH-Dehydrogease und kann deswegen nur in Mitochondrien nicht aber im isolierten Cytochrom bc_1 Komplex markiert werden.

LITERATURVERZEICHNIS:

Arnon D.I. (1949)

Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris.

Plant Physiol. 24, 1-15

Arnon, D.I., Tsujimoto, H.Y. und McSwain, B.D. (1967)

Ferredoxin and photosynthetic photophosphorylation.

Nature 214, 562-566

Alexandre, A. und Lehninger, A. L. (1984)

Bypasses of the antimycin A block of mitochondrial elektrontransport in relation to ubisemiquinone function.

Biochim. Biophys. Acta, 767, 120-129

Beattie, D. S. und Villalobo, A. (1982)

Energy transduction by the reconstituted bc₁ complex from yeast mitochondria.

J. Biol. Chem 257, 14745-14752

Berden, J.A. und Slater, E.C. (1970)

The reaction of antimycin with cytochrome b preparation active in reconstitution of the respiratory chain.

Biochim. Biophys. Acta 216, 237-249

Berden, J.A. und Slater, E.C. (1972)

The allosteric binding of antimycin to cytochrome b in the mitochondrial membrane.

Biochim. Biophys. Acta 256, 199-215

Berthold, D.A., Babcock, G.T. und Yocum, C.F. (1981)

A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes.

FEBS Lett. 134, 231-234

- Birch, A.J., Cameron, D.W., Harada, Y., und Rickards, R.W.
(1962)
Studies in relation to biosynthesis. Part XXV. A
preliminary study of the antimycin A-complex.
J. Chem. Soc. 1, 303-305
- Bogorad, L. (1988), Vortrag auf dem Kongreß: Plant membranes:
structure, assembly and function, Cardiff April 1988
- Boschetti, A., Tellenbach, M. und Gerber, A. (1985)
Covalent binding of 3-azido-monuron to thylakoids of DCMU-
sensitive and-resistant strains of Chlamydomonas
reinhardtii.
Biochim. Biophys. Acta 810, 12-19
- Brandon, J.R., Brocklehurst, J.R. und Lee, C.P. (1972)
Effect of antimycin A and 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-
oxide on the respiratory chain of submitochondrial
particles of beef heart.
Biochem. 11, 1150-1154
- Briquet, M. und Gouffeau, A. (1981)
Modification of the spectral properties of cytochrome b in
mutants of Saccharomyces cerevisiae resistant to
3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea.
Eur. J. Biochem. 117, 333-339
- Bryla, J. und Kaniuga, Z. (1968)
On the binding of antimycin to the respiratory chain.
Biocim. Biophys. Acta. 153, 910-913
- Chevillotte-Brivet, P., Meunier-Lemesle D., Forget, N. und
Pajot, P. (1983)
Is Cytochrome b really the antimycin-binding component of
the cytochrome b-c₁ complex of yeast mitochondria.
Eur. J. Biochem. 129, 653-661

Chua, N.-H. (1980)

Electrophoretic analysis of chloroplast proteins.
Methods in Enzymol. 69, 434-446

Clejan, L. und Beattie, D.S. (1986)

Preparation of complex III from yeast mitochondria and related methodology.
Methods in Enzymol. 126, 173-180

Colson, A.-M. und Slonimski, P.P (1979)

Genetic localization of diuron- and mucidin-resistant mutants relative to a group of loci of the mitochondrial DNA controlling coenzyme QH₂-cytochrome c reduktase in Saccharomyces cerevisiae.
Molec. gen. Genet. 167, 287-298

Convent, B. und Briquet, M. (1978)

Properties of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea and other inhibitors of the Cytochrome bc₁ segment of the respiratory chain in Saccharomyces cerevisiae.
Eur. J. Biochem. 82, 473-481

Cramer, W.A., Black, M.T., Widger, W.R. und Girvin, M.E. (1987)

Structure and function of photosynthetic cytochrome b-c₁ and cytochrome b₆-f complexes .
In: The light reactions, Ed. Barber J., Elsevier, 447-493

Crofts, A., Robinson, H., Andrews, K., van Doren, S. und Berry, E. (1987)

Catalytic sites for reduction and oxidation of quinones.
In Cytochrome systems: Molecular Biology and Bioenergetics, Ed. Papa S., Plenum Press

Crowther, D. und Hind, G. (1982)

Cycles and Q cycles in plant photosynthesis.
In: Function of quinones in energy conserving systems, Ed. Trumpower, B.L., Academic Press, 499-510

- Das Gupta, U. und Rieske, J.S. (1973)
Identification of a protein component of the antimycin-binding site of the respiratory chain by photoaffinity labeling.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 1247-1254
- Davenport, J.W. und Mc Carty, R.E. (1984)
An analysis of proton fluxes coupled to electron transport and ATP synthesis in chloroplast thylakoids.
Biochem. Biophys. Acta 766, 363-374
- de Wolf, F.A., Galmiche, J.M., Kraayenhof, R. und Girault, G. (1985)
Single-turnover flash-induced ATP synthesis in photo-system I-enriched subchloroplast vesicles.
FEBS Lett. 192, 271-274
- Deul, D.H. und Thorn, M.B. (1962)
Effects of 2,3-dimercaptopropanol and antimycin on absorption spectra of heart-muscle preparations.
Biochim. Biophys. Acta 59, 426-436
- De Vries, S.D., Albracht, S.P.J., Berden, J.A. und Slater, E.C. (1982)
The pathway of electrons through QH₂:Cytochrome c oxidoreductase studies by pre-steady-state kinetics.
Biochim. Biophys. Acta 681, 41-53
- De Vries, S. (1986)
The pathway of electron transfer in the dimeric QH₂:cytochrome c oxidoreductase.
J. Bioenerg. Biomem. 18, 195-224
- Dickie, J.P., Loomans, M.E., Farley, T.M. und Strong, F.M. (1963)
The chemistry of antimycin A. XI. N-substituted 3-formamidosalicylic amides.
J. Med. Chem. 6, 424

Di Rago, J.P., Perea, X. und Colson, A.-M. (1986)

DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome b gene of Saccharomyces cerevisiae

FEBS Lett. 208, 208-210

Engel, W.D., Schagger, H. und von Jagow, G. (1980)

Ubichinol-cytochrome c reduktase (EC 1.10.2.2), isolation in Triton x-100 by hydroxyapatite and gel chromatography, structural and functional properties.

Biochim. Biophys. Acta 592, 211-222

Engel, W.D. (1983)

Isolierung und Charakterisierung des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette sowie seiner Eisen-Schwefel-Protein-Untereinheit.

Dissertation, Universität München

Estabrook, R.W. (1967)

Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios.

Methods in Enzymol. 10, 41-47

Gabellini, N. (1988)

Organization and structure of the genes for the cytochrome b/c₁ complex in purple photosynthetic bacteria. A phylogenetic study describing the homology of the b/c₁ subunits between prokaryotes, mitochondria and chloroplasts.

J. Bioenerg. Biomem. 20, 59-83

Gregory, R.B. und Berry, M.N. (1986)

Effects of long-chain fatty acids on the inhibition by antimycin of respiration in hepatocytes and isolated mitochondria from rat liver.

Eur. J. Biochem. 160, 645-649

Grimmelikhuijzen, C.J.P., Marres, C.A.M. und Slater, E.C.
(1975)

Antimycin-insensitive mutants of Candida utilis. II. The effects of antimycin on cytochrome b .

Biochim. Biophys. Acta 376, 533-548

Hartung, A. (1985)

Energiekonservierung im cyclischen und nicht-cyklischen Elektronentransport isolierter Thylakoidmembranen.

Dissertation, Ruhr-Universität Bochum

Hartung, A. und Trebst, A. (1985)

New inhibitors of the cytochrome b_6/f -complex in ferredoxin catalyzed cyclic photophosphorylation.

Physiol. Veg. 23, 635-648

Hatefi, Y. (1985)

The mitochondrial elektron transport and oxidative phosphorylation system.

Ann. Rev. Biochem. 54, 1015-1069

Hauska, G., Hurt, E., Gabellini, N. und Lockau, W. (1983)

Comparative aspects of quinol-cytochrome c/plastocyanin oxidoreductases.

Biochim. Biophys. Acta 726, 97-113

Ho, S.H.K., Das Gupta, U. und Rieske, J.S. (1985)

Detection of antimycin-binding subunits of complex III by photoaffinity-labeling with an azido derivative of antimycin.

J. Bioenerg. Biomem. 17, 269-282

Hosler, J.P. und Yocum, C.F. (1985)

Evidence for two cyclic photophosphorylation reactions concurrent with ferredoxin-catalyzed non-cyclic electron transport.

Biochim. Biophys. Acta 808, 21-31

Hosler, J.P. und Yocum, C.F. (1987)

Regulation of cyclic photophosphorylation during
ferredoxin-mediated electron transport.

Plant Physiol. 83, 965-969

Howell, N., Appel, J., Cook, J.P., Howell, B. und Hauswirth,
W.W. (1987)

The molecular basis of inhibitor resistance in a mammalian
mitochondrial cytochrome b mutant .

J. Biol. Chem. 262, 2411-2414

Hurt, E. und Hauska, G. (1981)

Cytochrome f/b₆ complex of five polypeptides with
plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from
spinach chloroplasts.

Eur. J. Biochem. 117, 591-599

Jakobs, E.E. und Sanadi, D.R. (1960)

The reversible removal of cytochrome c from mitochondria.

J. Biol. Chem. 235, 531-534

Japa, S., Zhu, Q. und Beattie, D.S. (1987)

Subunit VII, the ubiquinone-binding protein of the
cytochrome b-c₁ complex of yeast mitochondria is involved
in electron transport at center o and faces the matrix side
of the membrane.

J. Biol. Chem. 262, 5441-5444

Keulen, M.A. und Berden, J.A. (1985)

Antimycin binds to a small subunit of the ubiquinol:cyto-
chrome c oxidoreductase.

Biochim. Biophys. Acta 808, 32-38

King, T.E. (1985)

Ubiquinone proteins in : Coenzyme Q, Ed. Lenaz G, John
Wiley & Sons Ltd., 391-408

- Kunze, B., Höfle, G. und Reichenbach, H. (1987)
The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria:
production, physico-chemical and biological properties.
J. Antibiotics XL,3 258-265
- Kurowski, B. und Ludwig, B. (1987)
The genes of the Paracoccus denitrificans bc₁ complex.
J. Biol. Chem. 262, 13805-13811
- Lin, C.-T., Siew, P.-Y. und Byrn, S.R. (1978)
Solid-state dehydrochlorination and decarboxylation
reactions. Part 1. Reactions of p-aminosalicylic acid
hydrochloride and p-aminosalicylic acid, and revised crystal
structure of p-aminosalicylic acid.
J. Chem. Soc. Perkin Transactions II, 957-962
- Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D. und Trumpower, B.L. (1986)
Purification of cytochrome bc₁ complexes from phylo-
genetically diverse species by a single method.
Methods in Enzymol. 126, 181-191
- Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D., Robertson, D.E. und Trumpower, B.L. (1987)
Purification of highly active cytochrome bc₁ complexes from
phylogenetically diverse species by a single chromato-
graphic procedure.
Biochim. Biophys. Acta 891, 227-241
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L. und Tolbert, N.E.
(1978)
A modification of the Lowry procedure to simplify protein
determination in membrane and lipoprotein samples.
Anal. Biochem. 87, 206-210
- Mills, J.D., Slovacek, R.E. und Hind, G. (1978)
Cyclic electron transport in isolated intact chloroplasts;
further studies with antimycin.
Biochim. Biophys. Acta 504, 298-309

Mitchell, P. (1975)

Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c₁ complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle.
FEBS Lett. 56, 1-6

Mitchell, P. (1979)

Compartmentation and communication in living systems.
Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems.
Eur. J. Biochem. 95, 1- 20

Mitchell, P. und Moyle, J. (1985)

The role of ubiquinone and plastoquinone in chemiosmotic coupling between electron transfer and proton translocation.
In Coenzyme Q, Ed. Lenaz G, John Wiley & Sons Ltd., 145-163

Moerschel, E. und Staehelin, L.A. (1983)

Reconstitution of cytochrome f/b₆ and CF₀-CF₁ ATP synthetase complexes into phospholipid and galactolipid liposomes.
J. Cell Biol. 97, 301-310

Moos, D.A. und Bendall, D.S. (1984)

Cyclic electron transport in chloroplasts, the Q-cycle and the site of action of antimycin.
Biochim. Biophys. Acta 767, 389-395

Murphy, D.J. (1986)

The molecular organisation of the photosynthetic membranes of higher plants.
Biochim. Biophys. Acta 864, 33-94

Nalecz, M.J. und Azzi, A. (1985)

Functional characterization of the mitochondrial cytochrome b-c₁ complex: steady-state kinetics of the monomeric and dimeric forms.
Arch. Biochem. Biophys. 240, 921-931

Neft, N. und Farley, T.M. (1971)

Inhibition of electron transport by substituted salicyl-N-(n-octadecyl)amides.

J. Med. Chem 14, 1169-1170

Neft, N. und Farley, T.M. (1972)

Studies on the biosynthesis of antimycin A: I incorporation of ¹⁴C-labeled metabolites into the 3-formamidosalicyl moiety.

J. Antibiotics XXV, 298-303

Nelson, N., Drechsler, Z. und Neumann, J. (1970)

Photophosphorylation in Digitonin subchloroplast particles.

J. Biol. Chem. 245, 143-151

Nelson, B.D., Norling, B., Perlsson, B. und Ernster, L. (1972)

Influence of ubiquinone on the rate of antimycin binding to submitochondrial particles.

Biochem. Biophys Acta 267, 205-210

Oettmeier, W., Masson, K., Soll, H.-J., Hurt, E. und Hauska, G. (1982)

Photoaffinity labelling of plastoquinone binding sites in chloroplast cytochrome b₆/f complex.

FEBS Lett. 144, 313-317

Oettmeier, W., Soll, H.-J. und Neumann, E. (1984)

Herbicide and plastoquinone binding to photosystem II

Z. Naturforsch. 39c, 393-396

Oettmeier, W., Godde, D., Kunze, B. und Höfle, G. (1985)

Stigmatellin. A dual inhibitor of photosynthetic electron transport.

Biochim. Biophys. Acta 807, 216-219

Ohnishi, T. und Trumpower, B.L. (1980)

Differential effects of antimycin on ubisemiquinone bound in different environments in isolated succinate cytochrome c reductase complex.

J. Biol. Chem. 255, 3278-3284

Patel, P.K., Bendall, D.S. und Ridley, S.M. (1986)

Site of action of a halogenated 4-hydroxypyridine on ferredoxin-catalysed cyclic photophosphorylation.

FEBS Lett. 206, 249-252

Pucheu, N., Oettmeier, W., Heisterkamp, U., Masson, K. und Wildner, G.F. (1984)

Metribuzin-resistant mutants of Chlamydomonas reinhardtii.

Z. Naturforsch. 39c, 437-439

Rich, P.R. (1984)

Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes.

Biochim. Biophys. Acta 768, 53-79

Rich, P.R. (1988)

A critical examination of the supposed variable proton stoichiometry of the chloroplast cytochrome bf complex.

Biochim. Biophys. Acta 932, 33-42

Rieske, J.S. (1967)

Antimycin A

In: Antibiotics I Mechanism of action, Ed. Gottlieb, D und Shaw, P., Springer Verlag , 542-584

Rieske, J.S. (1976)

Composition, structure and function of complex III of the respiratory chain.

Biochim. Biophys. Acta 456, 195-247

- Rieske, J.S. (1986)
Experimental observations on the structure and function of mitochondrial complex III that are unresolved by the protonmotive ubiquinone-cycle hypothesis.
J. Bioenerg. Biomem. 18, 235-257
- Roberts, H., Smith S.C., Marzuki S. und Linnane A.W. (1980)
Evidence that cytochrome b is the antimycin-binding component of the yeast mitochondrial cytochrome bc₁ complex.
Arch. Biochem. Biophys. 200, 387-395
- Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A. und von Jagow, G. (1985)
Isolation and amino sequence of the smallest subunit of beef heart bc₁ complex.
FEBS Lett. 190, 89-94
- Scott, P.M. (1965)
Chemical studies concerning the possible role of chromanyl phosphates and quinones in oxidative phosphorylation.
J. Biol. Chem. 240, 1374-1380
- Selak, M.A und Whitmarsh, J. (1982)
Kinetics of the electrogenic step and cytochrome b₆ and f redox changes in chloroplasts; evidence for a Q cycle.
FEBS Lett. 150, 286-292
- Slater, E.C. (1973)
The mechanism of action of the respiratory inhibitor, antimycin.
Biochim. Biophys. Acta 301, 129-154
- Slovacek, R.E. und Hind, G. (1978)
Flash spectroscopic studies of cyclic electron flow in intact chloroplasts.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 901-906

Smith, A.L. (1967)

Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria: slaughterhouse material, small-scale. Methods of Enzymol. 10, 81-86

Tagawa, K. und Arnon, D.I. (1962)

Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in biological production and consumption of hydrogen gas. Nature, 195, 537-543

Tamelen, E.E., Dickie, J.P., Loomans, M.E., Dewey, R.S. und Strong, F.M. (1961)

The chemistry of antimycin A. X. Structure of the antimycins. J. American. Soc. 83, 1639-1646

Thomas, P.E., Ryan, D. und Levin, W. (1976)

An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 75, 168-176

Tischer, W. und Strotmann, H. (1977)

Relationship between inhibitor binding by chloroplasts and inhibition of photosynthetic electron transport. Biochim. Biophys. Acta 460, 113-125

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979)

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354

Trebst, A. und Hauska, G. (1974)

Energiekonservierung in der photosynthetischen Membran der Chloroplasten. Naturwissenschaften 61, 308-316

Trebst, A. (1986)

Die Topologie der integralen Proteinkomplexe des photosynthetischen Elektronentransportsystems in der Membran.

In: Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften, Vorträge N 343, Westdeutscher Verlag, 35-61

Trebst, A. (1980)

Inhibitors in electron flow: tools for the functional and structural localization of carriers and energy conservation sites.

Methods in Enzymol. 69, 675-715

Tripathy, B.C. und Rieske, J.S. (1985)

Antimycin-resistant alternate electron pathway to plastocyanin in bovine-heart complex III.

J. Bioenerg. Biomem. 17, 141-150

Tsai, A. und Palmer, G. (1986)

The role of phospholipids in the binding of antimycin to yeast complex III.

Biochim. Biophys. Acta 852, 100-105

Tzagaloff, A. (1982)

Mitochondria, Plenum Press, New York

Velthuys, B.R. (1978)

A third site of proton translocation in green plant photosynthetic electron transport.

Proc. Natl. Acad. Sci. 75, 6031-6034

Von Jagow, G., Schagger, H., Riccio, P., Klingenberg, M. und Kolb, H.J. (1977)

Bc₁ complex from beef heart: Hydrodynamic properties of the complex prepared by a refined hydroxyapatite chromatography in Triton X-100.

Biochim. Biophys. Acta 462, 549-558

- Von Jagow, G., Link, T.A. und Ohnishi, T. (1986)
Organization and function of cytochrome b and ubiquinone in the cristae membrane of beef heart mitochondria.
J. Bioenerg. Biomem. 18, 157-179
- Von Jagow, G. und Link, T.A. (1986)
Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc₁ complex.
Methods of Enzymol. 126, 253-271
- Weiss, H., Linke, P., Haiker, H. und Leonard, K. (1987)
Structure and function of the mitochondrial ubiquinol: cytochrome c reductase and NADH:Ubiquinone reductase.
Biochem. Soc. Transactions 15, 100-102
- Widger, W.R., Cramer, W.A., Herrmann, R.G. und Trebst, A. (1984)
Sequence homolgy and structural similarity between cytochrome b of mitochondrial complex III and the chloroplast b₆-f complex: position of the b hemes in the membrane.
Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 674-678
- Wikström, M.K.F. und Berden, J.A. (1972)
Oxidoreduction of cytochrome b in the presence of antimycin.
Biochim. Biophys. Acta 283, 403-420
- Wikström, M., Krab, K. und Saraste, M. (1981)
Proton-translocating cytochrome complexes.
Ann. Rev. Biochem 50, 623-655
- Wikström, M. und Saraste, M. (1984)
The mitochondrial respiratory chain. .
In: Bioenergetics, Ed. Ernster, Elsevier, 49-93

Wikström, M. und Krab, K. (1986)

The semiquinone cycle. A hypothesis of electron transfer and proton translocation in cytochrome bc-type complexes.
J. Bioenerg. Biomem. 18, 181-193

Willms, I., Malkin, R. und Chain, R.K. (1987)

Oxidation-reduction reactions of cytochrome b₆ in a liposome-incorporated cytochrome b₆f complex.
Arch. Biochem. Biophys. 258, 248-258

Willms, I., Malkin, R. und Chain, R.K. (1988)

Quinone interactions with the chloroplast cytochrome b₆-f complex.
Arch. Biochem. Biophys. 263, 36-44

Wilson, E., Farley, T.M. und Takemoto, J.Y. (1985)

Photoaffinity labeling of an antimycin-binding site in Rhodopseudomonas sphaeroides.
J. Biol. Chem. 260, 10288-10292

Yang, F.-D., Yu, L. und Yu, C.A. (1986)

Involvement of a specific phospholipid in the oxidation of ubiquinol in the cytochrome bc₁ complex.
Biophys. J. 49, 96a

Yang, X., Ljungdahl, P.O., Payne, W.E. und Trumpower, B.L. (1987)

Structure-function relationship in the three-subunit cytochrome bc₁ complex of Paracoccus denitrificans.
In: Bioenergetics: Structure and function of energy transducing systems, Ed. Ozawa T. und Papa S., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer Verlag Berlin, 63-80

Yu, L., Yang, F.-D., Yu, C.-A., Tsai, A.-L. und Palmer, G.
(1986)

Identification of ubiquinone-binding proteins in yeast mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase using an azido-ubiquinone derivative.

Biochim. Biophys. Acta 848, 305-311

Zhu, Q.-S. und Beattie, D.S, (1988)

Direct interaction between yeast NADH-Ubiquinone oxidoreductase, succinate-ubiquinone oxidoreductase, and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase in the reduction of exogenous quinones.

J. Biol. Chem 263, 193-199

LEBENS LAUF

Name:	Maria Freudenberg	
Geburtsdatum:	11.11.1958	
Geburtsort:	Heidelberg	
Familienstand:	ledig	
Eltern:	Gisela Freudenberg, geb. Dumur Hermann Freudenberg	
Grundschule:	Pestalozzischule Weinheim	1965-1968
Gymnasium:	Neusprachliches Gymnasium Weinheim	1968-1978
	Abitur	10/1978
Hochschulen:	Freie Universität Berlin	1979-1981
	Vordiplom	7/1981
	Technische Universität München	1981-1985
Diplomarbeit:	Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried Prof. H.L. Sänger Abteilung Viroidforschung 'Auswirkung einer Viroiderkrankung auf den Phytohormonhaushalt'	8/1984-1/1985
	Diplomprüfung	7/1985
Promotion:	Ruhr Universität Bochum Prof. A. Trebst Lehrstuhl Biochemie der Pflanze	seit 10/1985

